

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Etude de l'expression de P16<sup>INK4A</sup> dans un modèle de différenciation épidermique

Bruyère, Céline

*Award date:*  
2005

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**ETUDE DE L'EXPRESSION DE P16<sup>INK4A</sup> DANS UN MODELE DE DIFFERENCIATION  
EPIDERMIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Céline BRUYERE  
Juin 2005

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18- Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Etude de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans un modèle de différenciation épidermique**

BRUYERE céline

### Résumé

p16<sup>INK4a</sup> est un régulateur du cycle cellulaire qui agit sur la voie de la protéine du rétinoblastome (pRB). Il inhibe le complexe formé par la kinase dépendante des cyclines CDK4 et par la cycline D1. Ce complexe inactive pRB par phosphorylation ce qui entraîne la libération du facteur de transcription E2F qui induit des gènes responsables de l'entrée en phase S du cycle cellulaire. p16<sup>INK4a</sup> est dès lors un inhibiteur du cycle cellulaire et donc un suppresseur de tumeur, muté dans bon nombre de cancers.

Notre travail a consisté en une caractérisation de l'expression de cette protéine dans des kératinocytes épidermiques normaux en culture autocrine. Dans certaines conditions de culture, une décroissance de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est observée avec la différenciation cellulaire *in vitro* alors que par immunohistochimie aucune expression n'est détectée dans l'épiderme *in vivo*. Une telle décroissance de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est également observée *in vivo* lors de la différenciation de tumeurs malignes des kératinocytes. Bien qu'étant un régulateur du cycle cellulaire et donc, à priori, devant présenter une localisation nucléaire, la protéine p16<sup>INK4a</sup> mise en évidence par microscopie confocale est massivement présente dans le compartiment cytoplasmique.

Enfin, la régulation de p16<sup>INK4a</sup> par une exposition de kératinocytes aux rayons ultraviolets a été approchée.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

**Promoteur:** M. Hérin

**Co-promoteur:** Y. Poumay

## Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur le professeur Michel Hérin pour m'avoir permis de passer ces quelques mois dans le Laboratoire Cellules et Tissus (LabCeTi), pour son soutien tout au long de mon travail, sa disponibilité, sa patience et surtout pour son enthousiasme.

Je voudrais également remercier le professeur Yves Poumay pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je remercie également Emilie Béra pour l'énorme aide qu'elle m'a apportée tout au long de mon mémoire ainsi que pour sa joie de vivre qui donne l'envie de travailler et qui met de la bonne humeur partout dans le laboratoire.

Je remercie Françoise Herphelin pour son soutien dans les moments les plus difficiles, pour son sourire, pour sa patience et le partage de son énorme savoir-faire.

Merci à Raphaël Déom pour son aide et sa sympathie.

Merci à Daniel Van Vlaender pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

Merci aussi à Annie Degen pour son enthousiasme, sa bonne humeur permanente et pour les bonnes adresses qu'elle connaît et qu'elle nous fait partager.

Merci également à Michèle Leclercq-Smekens pour ses bons conseils.

J'exprime également toute ma reconnaissance à toute l'équipe du laboratoire d'histologie-embryologie pour leur accueil chaleureux au sein de leur équipe.

Merci aux petits kératinocytes sans qui mon étude n'aurait pas été possible...

Je remercie également Virginie Brumenil et Hélène Ameels qui ont toutes les deux fait leur mémoire dans le même laboratoire, pour les coups de mains apportés par-ci par-là et pour leur soutien.

Merci aussi à mes amies Céline Divoy, Géraldine Laloux, Pauline Lamarre, Marie Godefroid et Florence Collignon pour le soutien apporté tout au long de ces mois de travail et loin de Pierre-Simon.

Et pour terminer un merci tout particulier à mes parents qui ont cru en moi dès le départ, qui ont toujours été là pour moi dans les moments de joie mais aussi dans les moments difficiles, et qui m'ont permis de faire les études qui me plaisaient, merci.

Un merci aussi à ma grand-mère et à mon grand-père qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont toujours épaulé.

## Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ARF: Alternative Reading Frame  
ARN : Acide Ribonucléique  
BAX: Bcl2 Associated X protein  
CDKN2a: Cyclin Dependent Kinases inhibitor 2a  
CDKs: Cyclin Dependent Kinases  
Cip/Kip: CDK interacting protein/ Kinase inhibitory protein  
CKI : Cyclin dependent kinase inhibitor  
DAB: diaminobenzidine  
DLU: Digital Light Unit  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EPSK : Epithélium Pavimenteux Stratifié Kératinisé  
HPV: Human Papillomavirus  
INK4 : Inhibitor Kinases 4  
K1 : Kératine 1  
K10 : Kératine 10  
K14 : Kératine 14  
K5 : Kératine 5  
KGM : Keratinocyte Growth Medium  
MDM2: Mouse Double Minutes 2  
MTS1: Multiple Tumor Suppressor 1  
NAK: Kératinocytes Abdominaux Normaux  
ORF: Open Reading Frame  
p16: p16<sup>INK4a</sup>  
PI3K: phosphatidylinositol 3 phosphate kinase  
pRB: protéine du retinoblastome  
UV : Rayons Ultraviolets

# Table des matières

## I. Introduction

1. Le kératinocyte.....	1
1.1 Le kératinocyte , principal constituant de l'épiderme.....	1
1.2 Organisation de l'épiderme.....	2
1.3 Les marqueurs de différenciation épidermique.....	3
1.4 Modèles de culture <i>in vitro</i> de kératinocytes épidermiques humains.....	4
2. p16 <sup>INK4a</sup> .....	5
2.1 Le cycle cellulaire.....	5
2.1.1 Généralités.....	5
2.1.2 Voies moléculaires régulant le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.....	5
2.1.3 Inhibiteurs du cycle cellulaire.....	6
2.1.4 La famille des protéines Cip/Kip.....	6
2.1.5 La famille de INK4.....	7
2.2 p53.....	8
2.3 La protéine du rétinoblastome (pRB).....	9
2.4 p16 <sup>INK4a</sup> .....	9
2.5 La voie de signalisation p16/CDK4/cyclineD1.....	11
2.6 La régulation de p16 <sup>INK4a</sup> .....	11
3. p16 <sup>INK4a</sup> et le kératinocyte.....	12
3.1 Expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans la peau.....	12
3.1.1 p16 et la peau normale.....	12
3.1.2 p16 et les tumeurs de la peau.....	12
3.1.2.1 p16 et les tumeurs malignes.....	12
3.1.2.2 p16 et les tumeurs bénignes.....	12
3.2 p16 et la sénescence cellulaire.....	13
3.2.1 p16 et la sénescence cellulaire.....	13
3.2.2 Les cellules hTERT.....	15
3.2.3 Ras, un oncogène qui induit la sénescence.....	15
3.3 Kératinocytes, p16 et human papillomavirus.....	16
3.3.1 Notes sur certains gènes de HPV.....	17
3.3.1.1 Le de gène E2.....	17
3.3.1.2 Le gène de E6.....	18
3.3.1.3 Le gène de E7.....	18
3.3.2 Les cellules E6E7.....	19
4. Objectif du mémoire.....	20

II.	Matériel et méthodes.....	21
1.	Culture de kératinocytes épidermiques humains.....	21
1.1	Mise en culture primaire.....	22
1.2	Culture secondaire.....	22
1.3	Congélation de cellules.....	23
1.4	Culture tertiaire.....	23
2.	Traitement des kératinocytes aux UV.....	24
3.	Extraction et concentration d'ARNmessagers (ARNm).....	25
3.1	Préparation d'oligo-dT couplés à de la cellulose.....	25
3.2	Extraction d'ARN.....	25
3.3	Concentration des ARNm.....	26
4.	Northern Blot.....	27
5.	Hybridation NB avec sondes d'ADN complémentaires (ADNc) marquées au <sup>32</sup> P.....	28
6.	Extraction de protéines.....	30
7.	Western Blot.....	30
8.	Fractionnement des cellules : séparation des noyaux de la fraction cytoplasmique.....	32
9.	Marquage et immunofluorescence.....	33
III.	Résultats.....	35
1.	Etude de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques humains cultivés en milieu autocrine.....	35
1.1	Modèle de culture de kératinocytes humains en culture autocrine.....	35
1.1.1	Analyse morphologique des kératinocytes en microscopie en contraste de phase.....	35
1.1.2	Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation épidermique.....	35
1.2	Expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques en culture autocrine.....	36

1.2.1	Expression des ARNmessagers de p16 <sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques en culture autocrine.....	36
1.2.2	Expression protéique de p16 <sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine.....	38
2.	Etude de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les fractions nucléaire et cytoplasmique de kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine.....	39
2.1	Préliminaires.....	39
2.2	Etude immunohistochimique, en microscopie confocale, de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine.....	40
2.3	Etude de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans les fractions nucléaire et cytoplasmique de kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine séparés par centrifugation.....	42
3.	Influence du milieu de culture sur l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques.....	43
4.	Etude de l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine exposés à des rayons ultraviolets.....	45
4.1	Préliminaires.....	45
4.2	Expression des ARNmessagers de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine et exposés aux UV.....	45
4.3	Expression de la protéine p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine et exposés aux UV.....	46
4.3.1	Expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques exposés à une dose de 500mJ/cm <sup>2</sup> de rayons ultraviolets...	46
4.3.2	Expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques exposés à plusieurs doses de rayons ultraviolets.....	47
IV.	Discussion et perspectives.....	48
1.	Les kératinocytes épidermiques normaux en culture autocrine expriment p16 <sup>INK4a</sup> .....	49
2.	L'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans notre modèle est régulée par la différenciation.....	50
2.1	Influence du milieu de culture sur l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> .....	50
2.2	Pourquoi p16 <sup>INK4a</sup> est-il régulé négativement par la différenciation dans notre modèle ?.....	51



3. Analogie entre l'expression de p16 <sup>INK4a</sup> dans notre modèle et celle observée dans les carcinomes épidermoïdes.....	52
4. p16 <sup>INK4a</sup> est exprimé non seulement dans les noyaux mais également dans le cytoplasme des kératinocytes.....	53
5. Réponse de p16 <sup>INK4a</sup> à l'irradiation aux UV de kératinocytes épidermiques.....	54
V. Bibliographie.....	55

# Introduction

## Avant-propos

Tout d'abord, je définirai brièvement le kératinocyte, matériel de mon étude. Ensuite, je parlerai succinctement de p16<sup>INK4a</sup>, protéine qui m'a plus particulièrement intéressée. Et enfin, dans la troisième partie, je résumerai les connaissances actuelles du rôle et de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes.

# 1. Le kératinocyte

## 1.1 Le kératinocyte, principal constituant de l'épiderme

La peau est constituée de trois couches bien distinctes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. C'est l'organe le plus volumineux du corps humain, représentant plus ou moins 6% de la masse corporelle totale et ayant une superficie variant de 1,7 à 2 m<sup>2</sup> chez l'adulte.

Selon sa localisation sur le corps humain et les besoins physiologiques, la peau varie en épaisseur, couleur et présence ou non de poils ou de glandes. Cependant, quelles que soient ses différentes localisations, les trois couches : épiderme, derme et hypoderme sont toujours présentes.

La peau remplit de nombreuses fonctions :

- Une fonction de protection : elle protège l'organisme contre les agressions physiques externes (fonctions assurées principalement par les couches épidermique et dermique) mais aussi contre la perte de fluide interne (ici, c'est exclusivement l'épiderme, grâce à sa couche cornée hydrophobe, qui est responsable de cette protection). La peau constitue également une barrière contre les bactéries et protège le corps des rayonnements ultraviolets.
- Une fonction métabolique : elle synthétise le pool de vitamine D de l'organisme à partir du cholestérol de l'épiderme mais aussi à partir des triglycérides stockés dans l'hypoderme.
- Une fonction sensorielle : elle contient de très nombreuses terminaisons nerveuses qui transmettent des sensations thermiques, tactiles et douloureuses.
- Une fonction de thermorégulation : notre organisme est soumis constamment aux variations de température. Différents mécanismes isothermiques sont mis en oeuvre notamment la distribution sanguine dermique. Quand il fait froid, le sang est maintenu à distance de la surface cutanée afin de ne pas perdre trop de chaleur ; la peau devient pâle. Cela est dû aux sphincters précapillaires qui se ferment et aux glomi de Masson qui souvrent.

Par contre, quand il fait chaud, les sphincters précapillaires s'ouvrent et les les glomi de Masson se ferment. Il s'en suit un apport important de sang vers les capillaires superficiels afin de perdre des calories par échange thermique avec l'extérieur. La peau devient rouge.

Les glandes sudoripares participent aussi à la thermorégulation du corps. Quand il fait chaud, la sudation augmente et en s'évaporant cette sueur refroidit le corps.

L'**épiderme** est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (E.P.S.K) formé par la différenciation d'un seul type cellulaire : le kératinocyte épidermique.

## Introduction

Les kératinocytes constituent le type cellulaire le plus représenté au niveau de l'épiderme (90% des cellules). La charpente qu'ils forment permet d'héberger d'autres types cellulaires : les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes.

Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes qui résident entre les cellules de la couche épineuse.

Les cellules de Merkel se retrouvent essentiellement au niveau de la couche de basale et sont associées à des terminaisons nerveuses.

Les mélanocytes produisent la mélanine et sont aussi localisés dans la couche basale. Cette mélanine contribue largement à la pigmentation de la peau. Elle chapeaute les noyaux et protège ainsi l'ADN contre les mutations induites par les UV.

La différenciation entamée par les kératinocytes est dite terminale car irréversible et aboutissant à une couche de cellules mortes remplies de kératine.

L'épaisseur optimale de l'épiderme est maintenue par les cellules de la couche basale qui prolifèrent et les cellules de la couche cornée qui desquament.

Si la couche cornée reste mince et il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé de type B dont l'épaisseur oscille entre 75 et 150µm.

Sur la plante des pieds et la paume des mains, la couche cornée est donc épaisse et l'épithélium formé est qualifié d'épithélium pavimenteux stratifié kératinisé de type, son épaisseur est de plus ou moins 600 µm.

## 1.2 Organisation de l'épiderme

En se différenciant, les kératinocytes forment les quatre couches typiques de l'épiderme (figure 1-1).

La *couche basale* est une couche simple constituée de petites cellules cubiques ou polyédriques reposant sur la lame basale. C'est la seule couche directement en contact avec le derme sous-jacent auquel elle adhère via des dispositifs d'ancrage appelés hémidesmosomes. C'est dans cette couche que se rencontrent les cellules souches. Les divisions cellulaires s'y déroulent et ce qui produit des cellules qui ensuite migrent vers les couches supérieures.

La lame basale sur laquelle repose les kératinocytes constitue la jonction entre le derme et l'épiderme : la jonction épidermo-dermique. Celle-ci est constituée de trois couches différentes : la lamina lucida, la lamina densa et la lamina sub-basale. Ses constituants essentiels permettant la cohésion de la jonction sont le collagène de type IV, les laminines, l'héparan sulfate et l'entactine. La laminine  $\gamma 5$  de la jonction épidermo-dermique s'associe avec l'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$  des hémidesmosomes des kératinocytes de la couche basale.

La *couche épineuse* constitue la couche la plus épaisse de l'épiderme vivant ; elle est constituée de plusieurs couches de kératinocytes ancrés les uns aux autres par des desmosomes qui forment des ponts d'union entre les kératinocytes de cette couche.

L'indentation entre les kératinocytes renforcée par les nombreux desmosomes sont responsables de la résistance mécanique de l'épiderme.

La *couche granuleuse* contient les kératinocytes qui deviennent pavimenteux et dont le cytoplasme se remplit de grains de kératohyaline. En plus de ceux-ci, les cellules contiennent des corps d'Odland aussi appelés corps lamellaires qui sont des corpuscules sphériques contenant des glycolipides et des phospholipides. Au niveau de cette couche, les noyaux des kératinocytes entrent en pycnose.

## Introduction

La *couche cornée* est formée de cellules mortes anucléées, appelées cornéocytes. Dans cette couche s'observe la dernière phase de la kératinisation. Elle a pour fonction d'isoler l'organisme de son environnement. Les cellules kératinisées sont enrobées de céramides qui assurent l'imperméabilité de l'épiderme.

A l'exception des kératines, qui forment des amas occupant en moyenne 80% du cytoplasme, presque tout le contenu cytoplasmique est dégradé.

### 1.3 Les marqueurs de différenciation épidermique

La différenciation des kératinocytes prend place dans les couches suprabasales de l'épiderme; les cellules de ces couches ne répliquent plus leur ADN mais continuent néanmoins à synthétiser des protéines. Une fois la cellule recrutée pour entamer le processus de différenciation, elle met en moyenne de 2 à 4 semaines pour atteindre la couche cornée et desquamer. Au cours de ce processus, le kératinocyte subit plusieurs changements structuraux et biochimiques.

Les molécules des filaments intermédiaires des kératinocytes basaux sont des kératines, appelées aussi cytokératines ou alpha-kératines. Il s'agit de protéines fibreuses dont la chaîne polypeptidique a un axe principal unique. Leur rôle est essentiellement structural. Les kératines K5 et K14 qui sont caractéristiques de la couche basale.

Actuellement, plus ou moins une vingtaine de kératines différentes sont connues chez l'homme dont certaines sont dites dures et se retrouvent dans les cheveux et les ongles.

D'un point de vue biochimique, deux types de kératines sont distinguées : les kératines de type 1 dites acides et les kératines de type 2 dites basiques. Tous les épithéliums contiennent des filaments intermédiaires de kératine, notamment K5 et K14, mais l'épiderme en contient d'autres kératines quasi spécifiques de certaines couches et ou de certaines régions. Les K1 et K10 sont spécifiques des couches suprabasales et K9 spécifique des paumes de mains et des plantes de pieds.

Le premier changement des constituants de la cellule s'observe au niveau des kératines spécifiques de la couche basale : K5 (58kDa) et K14 (50kDa). Dès que la cellule entre dans la couche épineuse, leur synthèse est arrêtée. C'est dans cette même couche que l'on voit apparaître deux autres types de kératines, les kératines K1 (67kDa) et K10 (56,5kDa).

Les filaments de K1 et K10 s'agrègent et forment des tonofilaments plus massifs que ceux de la couche basale. Le nombre de jonctions intercellulaires est augmenté.

Au niveau de la couche granuleuse, les cellules synthétisent de la filaggrine, une protéine basique dont la forme précurseur est contenue dans les grains de kératohyaline. Cette protéine agrège les tonofilaments de kératines pour former de larges structures macrofibrillaires. Plus tard, dans la couche cornée, ces agrégats de kératine occuperont la totalité de la cellule (Fuchs, 1993).

Dans les dernières étapes de la différenciation, en plus de la pycnose suivie de la lyse du noyau, les corps d'Odland fusionnent avec la membrane plasmique et larguent leur contenu (céramides) dans l'espace intercellulaire. Afin de former l'enveloppe cornée, des protéines riches en glutamine et en lysine sont déposées à la face interne de la membrane. L'involucrine est une de ces protéines, bien qu'elle soit déjà exprimée dans la couche épineuse. La loricrine est une autre de ces protéines et est exprimée plus tardivement que l'involucrine, elle n'apparaît que dans la couche granuleuse. (Holbrooks & Wolff, 1987 ; Steven et al., 1990).

#### 1.4 Modèles de culture *in vitro* de kératinocytes épidermiques humains

Le premier modèle permettant une large expansion *in vitro* de colonies de kératinocytes fut mis au point par Rheinwald et Green en 1975.

Pour permettre la prolifération des kératinocytes épidermiques, ils utilisent une couche nourricière de fibroblastes 3T3 (cellules murines) dont la multiplication est bloquée de manière irréversible par un traitement aux rayons gamma ou à la mitomycine. Les kératinocytes sont ensemencés sur cette couche.

Ces derniers adhèrent beaucoup mieux que les fibroblastes dans le fond de la boîte se multiplient et puis se stratifient. Petit à petit, ils repoussent les fibroblastes qui se détachent un à un et sont évacués de la boîte lors du changement de milieu de culture. Le milieu de culture utilisé contient du sérum de veau fœtal ainsi que de nombreux facteurs de croissance tels que l'insuline et l'epidermal growth factor (EGF). Malheureusement, les fibroblastes de la couche nourricière produisent une série de facteurs de croissance qui ne sont pas facilement identifiables ni paramétrables.

De plus, des marqueurs de la différenciation cellulaire tels que les kératines 1 et 10 de la couche épineuse ne sont pas détectés dans ce type de culture en immersion.

Afin d'éviter le problème posé par les facteurs de croissance non contrôlés de la culture établie par Rheinwald et Green, Boyce et Ham en 1983 ont développé un milieu de culture ne contenant pas de sérum. Ce milieu est le MCDB 153. Grâce à lui, la prolifération des kératinocytes épidermiques ne nécessite plus la présence d'une couche nourricière de fibroblastes mais juste une complémentation du milieu par de l'insuline, de l'extrait de glande pituitaire bovine et de l'EGF. Boyce et Ham ont montré que l'ajout de calcium dans le milieu favorise la prolifération des kératinocytes. Cependant, si cette concentration en calcium est supérieure ou égale à 1.0mM, la prolifération cellulaire diminue et laisse place au processus de différenciation.

En 1991, Cook et al. ont démontré qu'à partir d'un certain stade de la culture, il n'est plus nécessaire de fournir les facteurs de croissance aux cellules, celles-ci étant devenues capables de produire elles-mêmes les facteurs de croissance. En 1993, Pittelkow et al. ont montré qu'en culture autocrine, les récepteurs de l'EGF doivent être occupés pour qu'il y ait prolifération. Or, lorsque les kératinocytes sont devenus autonomes, ils produisent un facteur de croissance capable de se lier aux récepteurs de l'EGF, l'amphiréguline, qui permet la prolifération cellulaire en culture autocrine.

Grâce à ce type de culture, la composition du milieu de culture est contrôlée et les cellules suivent un processus de différenciation proche du processus de différenciation *in vivo* (Poumay & Pittelkow, 1995).

## 2.1 Le cycle cellulaire

### 2.1.1 Généralités

Le cycle cellulaire est le processus par lequel la cellule se multiplie par division cellulaire. Ce cycle joue un rôle essentiel dans le développement normal des organismes pluricellulaires et dans l'homéostasie tissulaire. Il existe une régulation très précise de ces divisions à différents niveaux du cycle. La perte de ces mécanismes de régulation peut conduire au développement d'un cancer.

Cette régulation se fait principalement lors de deux événements critiques : en phase S lors de l'initiation nucléaire de la synthèse d'ADN et en phase M lors de l'initiation de la mitose. Deux autres phases existent : la phase G1 et de la phase G2. Lors de la phase G1, la cellule se prépare pour la synthèse de l'ADN et contrôle l'intégrité de celui-ci avant l'entrée de la cellule en phase S. En phase G2, la duplication du génome de la cellule est achevée et elle se prépare à la mitose (figure 1-2).

Dans un tissu, la cellule reçoit simultanément différents signaux qui sont soit mitogènes soit anti-mitogènes. Ces signaux sont aussi bien des facteurs extracellulaires solubles tels que les facteurs de croissance ou des hormones que des forces d'interactions physiques avec d'autres cellules ou avec le substrat. La phase G1 est la période durant laquelle la cellule répond aux signaux extérieurs. Si les signaux reçus par les récepteurs en surface de la cellule et transmis au noyau via une voie de signalisation intracellulaire sont stimulateurs, les cellules complètent la phase G1 et entrent en phase S. Par contre si il n'y a pas de signaux stimulateurs ou s'il y a des signaux inhibiteurs de croissance, la cellule entre dans un état de quiescence appelé G0 (Fuxe 2001).

### 2.1.2 Voies moléculaires régulant le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire

La machinerie moléculaire qui contrôle la progression du cycle cellulaire est basée sur l'activité séquentielle d'une famille de protéines kinases appelées les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs (Cyclin dependent kinases). Pour être actives, ces kinases doivent s'associer à une sous-unité activatrice de protéines appelées les cyclines. Plusieurs CDKs jouent un rôle dans la transition de la phase G1 à la phase S. Chaque complexe d'holoenzymes contient une sous-unité régulatrice, la cycline et une sous-unité catalytique, la kinase dépendante des cyclines (Anxo Vidal, Andrew Koff, 2000).

Durant la progression à travers la phase G1, les premières CDKs activées sont les CDK4 et CDK6 qui se lient à des cyclines de type D; la quantité de cyclines de type D augmente et cette protéine s'associe et active CDK4 et CDK6 (Jonas Fuxe 2001). Les trois types de cyclines (D1, D2, et D3) sont exprimées spécifiquement selon le type cellulaire. De même, les sous-unités catalytiques CDK4 et CDK6 sont coexprimées dans plusieurs types cellulaires (Anxo Vidal, Andrew Koff, 2000).

Cette première vague d'activité de kinases dépendantes des cyclines D est suivie en phase G1 tardive par une augmentation de l'activité du complexe Cycline E-CDK2. La cycline E et la CDK2 sont exprimées dans tous les types cellulaires et leur assemblage en une kinase active n'est pas mitogène dépendante.

## Introduction

Les fonctions des cyclines D et E associées aux kinases durant la phase S sont de phosphoryler la protéine du rétinoblastome pRB et de libérer ainsi le facteur de transcription E2F d'un complexe inactif pRB-E2F (Figure 1-3) (Anxo Vidal, Andrew Koff, 2000). L'interaction du complexe pRB-E2F avec les gènes régulateurs du cycle cellulaire est importante pour l'arrêt du cycle cellulaire médié par pRB.

Les gènes cibles induits par E2F en réponse à la disruption du complexe pRB-E2F incluent des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADN ainsi que des protéines régulatrices du cycle cellulaire.

La phosphorylation de pRB est maintenue au cours du cycle cellulaire par un complexe cycline A/CDK2. La reformation du complexe pRB-E2F a lieu en phase M du cycle cellulaire par déphosphorylation de pRB très certainement par PP-1 (Anxo Vidal, Andrew Koff, 2000). Cependant, de études récentes ont montré que l'entrée en phase S n'est pas seulement contrôlée par la voie de pRB. En effet, des évidences s'accumulent pour dire que le proto-oncogène Myc est un élément central d'une voie parallèle à celle de pRB et coopérant avec cette dernière (Bartek et al., 2001). Le proto-oncogène *c-myc* est un facteur de transcription de la famille des protéines à motifs hélice-tour-hélice/leucine-zipper, capable d'induire l'entrée en phase S des cellules quiescentes.

### 2.1.3 Inhibiteurs du cycle cellulaire

L'activité des kinases CDK4/CDK6 et CDK2 est nécessaire pour la progression à travers la phase G1 et l'entrée en phase S du cycle cellulaire. En considérant l'importance de ces kinases dans cette progression, on comprend que leur activité est extrêmement régulée. Le contrôle de ces kinases s'effectue à différents niveaux : au niveau de l'accumulation des cyclines, au niveau de l'assemblage des complexes formés par les cyclines et les kinases et au niveau d'évènements de phosphorylations et déphosphorylations spécifiques. Une régulation supplémentaire est réalisée par l'association des CDKs avec des petites protéines inhibitrices, les CKIs (Cyclin dependent kinases inhibitors), les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines. Ces inhibiteurs bloquent physiquement l'activation des CDKs ou bloquent l'accès à leur substrat.

Il existe deux familles de ces inhibiteurs : les INK4 et la famille des protéines Cip/Kip (Cdk interacting protein/ Kinase inhibitory protein) (figure 1-3).

### 2.1.4 La famille des protéines Cip/Kip

Trois protéines constituent cette famille de protéines : p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup>.

Ces protéines contiennent des domaines homologues nécessaires pour la liaison et l'inhibition de complexes contenant les kinases dépendantes des cyclines 4 et 2 (CDK4 et CDK2) (Anxo Vidal, Andrew Koff, 2000).

Les membres de cette famille interfèrent avec les complexes CDKs/cyclines E et A en les inhibant et interfèrent également avec les complexes CDKs/cyclines D mais ces derniers conservent leur activité (Figure 1-3) (Fuxe, 2001).

La manière dont les protéines p21 et p27 inhibent leurs cibles a été mise à jour grâce à sur une étude structurale. Une hélice- $\alpha$  des protéines Cip/Kip initie le premier contact avec la cycline et une seconde hélice vient s'insérer dans la sous unité catalytique de la kinase dépendante des cyclines, bloquant de cette façon le chargement de l'ATP. Les changements importants de conformation de CDK2 bloquent la sous-unité catalytique dans une forme inactive. De manière surprenante, la majorité des complexes CDKs/cycline D contiennent p21 ou p27, ce



qui amène à croire que ces cellules ne contiennent pas de CDK4 active. Or, de récentes études ont montré que cette conformation représente la forme active des complexes CDKs/Cyclines D et que de faibles concentrations en protéines Cip/Kip inhibent CDK2 mais pas CDK4/6. Mais lorsque p27 est fortement exprimé dans la cellule, il peut inhiber l'activité de CDK4 aussi (Coqueret, 2003) (figure 1-4).

En fait, la liaison des protéines Cip/Kip aux complexes formés par les kinases dépendantes des cyclines et les cyclines de type D est nécessaire pour que la sérine/thréonine kinase soit active. Les protéines Cip/Kip ont donc un double rôle dans la régulation du cycle cellulaire, servant de régulateurs négatifs des kinases dépendantes des cyclines E et A et de régulateurs positifs des complexes CDK4-6/cycline D (Fuxe, 2001).

Les protéines Cip/Kip activent le complexe CDK4-6/cycline D en facilitant et en stabilisant l'association entre les sous-unités de la kinase et de la cycline (Fuxe, 2001).

Les protéines Cip/Kip sont des protéines nucléaires ayant pour fonction principale d'inhiber l'activité des complexes CDKs/cyclines et d'arrêter la progression du cycle cellulaire. Elles régulent également la dynamique de l'actine à travers l'inhibition de la voie des Rho-ROCK-LIMK. De récentes études ont démontré que ces protéines jouent un rôle à l'extérieur du noyau. En effet, p27<sup>KIP1</sup> serait lié à la régulation de la dynamique de l'actine et à la migration cellulaire. Il semblerait également que p21<sup>CIP1</sup> pourrait agir comme un inhibiteur des Rho-kinase (ROCK) et que p57<sup>KIP2</sup> module la localisation subcellulaire de LIMK qui est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation des filaments d'actine. L'inhibition de la voie des Rho par les membres de la famille des Cip/Kip conduit à la réorganisation des fibres de stress des filaments d'actine et promeut la migration cellulaire (figure 1-5) (Denicourt & Dowdy, 2004).

### 2.1.5 La famille de INK4

Les inhibiteurs INK4 p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> et p19<sup>INK4d</sup> (inhibitor kinases 4) sont appelés ainsi car ils inhibent les CDK4, ce qui a pour effet d'arrêter la progression du cycle cellulaire (figure 1-6). Les quatre membres de cette famille ont des propriétés biochimiques similaires : tous se lient aux CDK4 et CDK6 et inhibent l'activité kinase du complexe CDK4-6/ cyclines D. En général, les protéines de cette famille entrent en compétition avec les cyclines de type D pour la liaison avec les sous unités des CDKs. Les INK4 forment un complexe binaire inactif avec les CDKs et bloquent de cette manière leur capacité d'interaction avec les cyclines de type D mais aussi avec les protéines Cip/Kip (Serrano 1997). En effet, les protéines INK4 séquestrent CDK4/6 en un complexe binaire CDK-INK4, libérant ainsi les protéines Cip/Kip qui y étaient liées, inhibant indirectement les complexes formés par les cyclines E et les kinases dépendantes des cyclines 2 (CDK2). Les INK4 sont donc des inhibiteurs directs des CDK4 mais aussi indirects des CDK2.

La capacité des INK4 d'inhiber le cycle cellulaire en phase G1 vient du fait que comme le complexe CDK4/cycline D est inhibé, pRB n'est pas phosphorylé et donc reste capable de réprimer le facteur de transcription permettant l'entrée du cycle en phase S, E2F (Charles J. Sherr 2000). Il faut noter cependant que la « disruption » du complexe CDK-cycline D et la libération des protéines Cip/Kip n'est pas suffisante pour arrêter le cycle cellulaire dans des cellules ne contenant pas de pRB. Cela est attribué au fait que l'activité du complexe CDK2/cycline E est normalement sous le contrôle du complexe pRB-E2F (Charles J. Sherr 2000).

Chez les humains, p16<sup>INK4a</sup> et p15<sup>INK4b</sup> sont étroitement liés sur le bras court du chromosome 9 (figure 1-7) tandis que p18<sup>INK4c</sup> est cartographié sur le chromosome 1 et p19<sup>INK4d</sup> sur le chromosome 19. De manière très surprenante, le gène de *INK4a* encode un deuxième

## Introduction

suppresseur de tumeur potentiel qui est p14<sup>ARF</sup> chez l'homme et p19<sup>ARF</sup> chez la souris (Charles J. Sherr 2000).

La caractéristique qui différencie les différents membres de la famille des INK4 est apparemment leur régulation transcriptionnelle différente. p16<sup>INK4a</sup> est surexprimé durant la sénescence cellulaire et en réponse à différents stimuli oncogéniques ; le promoteur de p15<sup>INK4b</sup> répond au facteur inhibiteur de croissance TGFβ et l'expression de p18<sup>INK4c</sup> et de p19<sup>INK4d</sup> est régulée de manière périodique durant le cycle cellulaire avec un maximum lors de la phase S du cycle (Serrano 1997).

La caractéristique structurale commune à tous les membres de la famille INK4 est la présence de motifs répétés d'ankyrine. Ces motifs d'ankyrine sont présents dans un grand nombre de protéines et sont généralement impliqués dans les interactions protéines-protéines.

Les motifs répétés d'ankyrine sont formés de 33 résidus protéiques identifiés pour la première fois dans deux régulateurs du cycle cellulaire de la levure, Cdc10 et Swi6 et par la suite, dans la protéine ankyrine du cytosquelette. Il sont retrouvés dans de nombreuses protéines avec des fonctions différentes incluant les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines, des protéines du cytosquelette, et des toxines de nombreuses variétés d'organismes allant des virus jusqu'aux humains (Leila K. Mosavi et al. 2002).

## 2.2 p53

Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription qui est activé suite à des dommages à l'ADN, l'hypoxie ou l'activation de proto-oncogènes via la modification de son interaction avec des protéines régulatrices. p53 arrête le cycle cellulaire et conduit la cellule à l'apoptose (figure 1-8A).

La protéine p53 a toujours été vue comme étant exclusivement un facteur de transcription qui exerce ses fonctions en transactivant une liste toujours grandissante de gènes cibles. Les exemples les plus probants de tels gènes sont p21 pour l'exécution de la fonction de l'arrêt du cycle cellulaire (figure 1-8 B) et PUMA, BAX (BC12 associated X protein), ... pour l'apoptose.

De plus, p53 contrôle sa concentration au sein de la cellule via l'induction de MDM2 (Mouse Double Minutes 2) étant une oncoprotéine cellulaire et de protéines additionnelles qui régulent sa dégradation par le protéasome (Schuler & Green, 2005).

Dans les cellules ayant subi des dommages à l'ADN, la voie de dégradation de p53 conduite par MDM2 est inactivée et, p53 est stabilisé. Cette stabilisation est une situation propice à la mort cellulaire et à l'apoptose car elle entraîne des modifications post-traductionnelles.

MDM2 se lie au domaine transactivateur du tétramère de p53 pour inhiber l'expression de gènes dépendants de p53 et manifeste aussi une activité ubiquitine ligase qui cible p53 pour la dégradation par le protéasome (figure 1-8C).

MDM2 peut aussi se lier directement au domaine de transactivation de p53 et diminuer ainsi son activité.

De manière tout à fait compréhensible, MDM2 est souvent amplifié et surexprimé dans certains cancers. Ceux-ci sont alors déficients en p53 alors qu'aucune mutation dans ce gène n'est observée. En agissant sur MDM2, p14<sup>ARF</sup> stabilise p53.

p53 est le suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers. En général, le fait qu'une mutation affecte un suppresseur de tumeur n'est pas suffisant pour déclencher un cancer. Dans le cas de p53, c'est un peu différent. En effet, si p53 est inhibé, il peut conduire à lui tout seul à la formation d'un cancer car il agit à plusieurs niveaux de régulation du cycle cellulaire (Chin et al., 1998).

## 2.3 La protéine du rétinoblastome (pRB)

Le gène du rétinoblastome fut identifié initialement comme un locus génétique associé avec le développement d'une tumeur héréditaire de l'œil. Il a été montré que c'est la perte de fonction de Rb qui est associé à la maladie et donc que Rb est un suppresseur de tumeur. Il fut établi que l'activité du facteur de transcription E2F est une cible clé pour que la protéine du rétinoblastome exerce sa fonction de suppresseur de tumeur. La fonction de pRb est régulée par phosphorylation et la kinase responsable de cette phosphorylation est CDK4 associée à la cycline D1. L'activité de ce complexe CDK4/cycline D1 est induite par des stimulations de la croissance cellulaire, initialisant une cascade d'événements conduisant à l'accumulation de E2F et à l'entrée en phase S du cycle cellulaire.

La progression dans la phase G1 demande la phosphorylation des protéines du type pRB, qui une fois phosphorylée, libère le facteur de transcription E2F. Les fonctions spécifiques des différents membres de la famille de pRB doivent encore être élucidées, bien qu'il y ait des différences significatives entre pRB et les deux autres membres de cette famille (p107 et p130).

Le complexe CDK4-6/Cycline D1 est indispensable pour la phosphorylation des protéines de la famille de pRB et leur activité est essentielle pour la prolifération de cellules normales. Il semblerait que la seule fonction essentielle de cette kinase soit de phosphoryler pRB.

Dans sa forme non phosphorylée ou hypophosphorylée, pRB s'associe à plusieurs facteurs de transcription et empêche de cette façon leur fonction de transactivation. Le facteur de transcription le plus régulé par la protéine du rétinoblastome est le facteur E2F qui active l'expression de protéines importantes dans le cycle cellulaire telles que les Cycline E et A. Une fois que pRB est phosphorylé, le facteur E2F est « relâché » et il peut ainsi activer la synthèse d'ADN (figure 1-9).

Les INK4 inhibent les kinases dépendantes des cyclines CDK4-6 et de ce fait maintiennent la protéine pRB dans son état non phosphorylé et donc l'arrêt de la croissance cellulaire.

Le facteur de transcription E2F contrôle un grand nombre de gènes : les gènes encodant l'activité de réplication de l'ADN, les gènes des régulateurs du cycle cellulaire mais contrôle aussi l'activité biosynthétique de nucléotides (tels que la thymidine kinase, la thymidylate synthase, la ribonucléotide réductase) et agit également sur la protéine suppresseur de tumeur p16<sup>INK4a</sup> (Nevins 2001).

## 2.4 p16<sup>INK4a</sup>

La protéine p16 est la première protéine de la famille de INK4 ayant été identifiée. Elle est encodée par un gène portant différents noms : INK4a (inhibiteur de kinase dépendante des cyclines 4), CDKN2a (cycline dépendant kinase inhibitor 2a) et MTS1 (multiple tumor suppressor). Cette protéine fut identifiée pour la première fois comme étant une protéine associée avec la kinase dépendante des cyclines CDK4 par des expériences de co-immunoprécipitation. p16<sup>INK4a</sup> fut cloné en exploitant son interaction spécifique avec les CDK4 et il a été démontré qu'il est un inhibiteur spécifique des complexes CDK4/ cycline D. p16<sup>INK4a</sup> agit donc comme un régulateur négatif de la prolifération cellulaire (Fuxe J 2001).

Le gène de p16<sup>INK4A</sup> est localisé sur le chromosome 9p21. Ce locus 21 du bras court du chromosome 9 fut suspecté comme contenant un suppresseur de tumeur car dans un bon nombre de tumeurs humaines, il est délété. p16 étant inactivé dans un très grand pourcentage de lignées cellulaires tumorales, il s'avéra donc être un suppresseur de tumeur.

## Introduction

Trois grands mécanismes sont connus pour inactiver ce gène :

- une délétion de deux allèles du gène ;
- une délétion dans un des allèle et une mutation dans le second allèle ;
- une délétion dans un des deux allèle et un « silençage » dû à une méthylation de l'allèle restant.

A partir du locus *INK4a*, deux transcrits différents sont produits, chacun étant sous le contrôle de son propre promoteur. Un des promoteur produit un transcrit formé par les exons 1 $\alpha$ , 2 et 3 qui encodent la protéine p16<sup>INK4a</sup>, tandis que l'autre promoteur forme un transcrit constitué des exons 1 $\beta$ , 2 et 3 codant pour la protéine p14<sup>ARF</sup> (Alternative Reading Frame). Les exons 2 et 3 sont les mêmes pour les deux transcrits mais ils sont lus dans des cadres de lecture différents ce qui explique pourquoi les séquences d'acides aminés de p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup> n'ont aucun rapport entre elles alors qu'elles sont composées des mêmes exons 2 et 3 (figure 1-8). p16<sup>INK4a</sup> est un composant clé de la voie de signalisation de la protéine du rétinoblastome tandis que p14<sup>ARF</sup> a un rôle majeur dans la voie de signalisation de p53. Le site start de transcription du promoteur de p16<sup>INK4a</sup> a été identifié comme étant une région de 71 pb importante pour l'activité du promoteur et localisée approximativement 500pb en amont du site start de transcription. L'expression de p14<sup>ARF</sup> induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et en phase G2 (Charles J.Sherr 2000). L'introduction de p14<sup>ARF</sup> dans des cellules mène à l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53, indiquant que p14<sup>ARF</sup> agit en amont de p53 (Charles J.Sherr 2000). p14<sup>ARF</sup> stabilise p53 en inhibant le régulateur négatif de p53 MDM2 (figure 1-10).

De nombreuses mutations dans le locus de *INK4a* affectent exclusivement la séquence d'acide aminés de p16<sup>INK4a</sup> ; cependant d'autres mutations touchent les deux séquences celle de p16<sup>INK4a</sup> et celle de p14<sup>ARF</sup>. Ces mutations affectent l'activité inhibitrice de p16<sup>INK4a</sup> mais pas celle de p14<sup>ARF</sup> (Manuel Serrano 1997). Récemment, il a aussi été mis en évidence que l'expression de ces deux protéines est régulée par le répresseur transcriptionnel du groupe Polycomb, bmi-1. En général, les protéines de cette famille modifient la structure de larges domaines de chromatine, menant à leur répression (F. Bringold, M. Serrano, 2000).

Le gène *INK4a* code pour une protéine de 16 kD. La structure cristallographique de p16<sup>INK4a</sup> montre un échafaudage structurel en forme de L (figure 1-11) de quatre répétitions d'ankyrine où chaque répétition forme un motif hélice tour hélice (Tang et al. 2003). La troisième répétition d'ankyrine de p16<sup>INK4a</sup> semble être impliquée dans l'interaction avec CDK4. En effet, un petit peptide dérivé de la troisième ankyrine, lie et inhibe CDK4.

Il a été proposé que p16<sup>INK4a</sup> se lie à CDK4 sur une surface discrète qui recouvre en partie le site de liaison de p27<sup>KIP1</sup>. La relation entre p16<sup>INK4a</sup> et la cycline D semble complexe. Le site de liaison de p16<sup>INK4a</sup> sur CDK4 est distant du site de liaison prédit de la cycline D et il est possible *in vitro* d'obtenir le complexe ternaire formé de *INK4/CDK4/cycD*. Cependant, les protéines *INK4* déstabilisent le complexe *CDK4/cyclineD1 in vitro* et des mutations qui diminuent la liaison de p16<sup>INK4a</sup> réduisent aussi l'affinité pour la cycline D1. Ces observations suggèrent que les sites de liaisons de la cycline D1 et de p16<sup>INK4a</sup> ne se chevauchent pas mais sont en communication conformationnelle. p16<sup>INK4a</sup> pourrait inhiber CDK4 en stabilisant une conformation catalytique inactive, avec une plus faible affinité pour la cycline D (Manuel Serrano 1997).

## 2.5 La voie de signalisation p16/CDK4/cycline D

La protéine issue du gène INK4a contribue à maintenir la protéine pRb dans son état non phosphorylé. p16<sup>INK4a</sup> a la capacité de lier les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 et d'inhiber leur activité kinase. De ce fait, p16 est capable de bloquer le passage de la phase G1 en phase S du cycle cellulaire dans les cellules qui ont une protéine pRb fonctionnelle. p16<sup>INK4a</sup> peut donc inhiber l'activité des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6 en causant une déphosphorylation de pRb et donc en même temps, une diminution de l'expression des gènes dépendants du facteur de transcription E2F qui contrôle la progression du cycle cellulaire (figure 1-9).

p16<sup>INK4a</sup> maintient la protéine du rétinoblastome dans un état actif d'hypophosphorylation. INK4a est induit par E2F (figure 1-12) (Baldwin et al., 2003).

## 2.6 La régulation de p16<sup>INK4a</sup>

La principale régulation des niveaux intracellulaires de p16<sup>INK4a</sup> apparaît au niveau transcriptionnel. L'abondance de l'ARN messenger de p16<sup>INK4a</sup> dans les différents tissus est assez faible mais il est malgré tout possible de le détecter par des techniques de RT-PCR. L'ARN messenger de p16<sup>INK4a</sup> est extrêmement stable, le temps de demi-vie de la protéine varie de 8 à 18 heures, ce qui équivaut à un temps plus long que celui de la cycline D1. Cette stabilité remarquable aussi bien au niveau des protéines qu'au niveau de l'ARNm suggère que le rôle biologique de p16<sup>INK4a</sup> n'est pas contrôlé par des réponses à court terme comme les transitions à l'intérieur du cycle cellulaire.

L'accumulation des protéines et de l'ARN messenger de p16<sup>INK4a</sup> est observé en réponse à différents stimuli ou conditions : la sénescence cellulaire, Ras, l'inactivation de Rb, les ultraviolets,...

### 3.1 Expression de p16<sup>INK4a</sup> dans la peau

#### 3.1.1 p16 et la peau normale

Selon la littérature (Ahmed et al., 1999), dans la peau normale, *in vivo*, aucune expression de p16 n'est détectée par immunohistochimie (Figure 1-13).

Par contre, en culture, une étude menée par Chaturvedi *in vitro* en 2003 a montré une augmentation de l'expression protéique de p16<sup>INK4a</sup> du stade de sous-confluence au stade de post-confluence (Chaturvedi et al., 2003). Cependant, au niveau des ARNm, les auteurs ne détectent aucune d'expression.

Quand l'épiderme est exposé à un rayonnement ultraviolet, une augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est observée par une détection immunohistochimique (Ahmed et al., 1999).

Des études ont été menées pour faire une analyse de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques en culture traités aux UV. Une diminution du niveau des ARNm de p16 est observée deux heures après le traitement. Cette diminution est suivie ensuite d'une augmentation après 24 heures pour enfin revenir à un niveau basal 48 heures après le traitement. Les mêmes résultats sont observés au niveau protéique (Chazal et al., 2002).

Les rayons ultraviolets induisent des mutations dans les cellules épidermiques et sont impliqués dans les cancers de la peau causés par le soleil. Les cellules doivent réparer ces dommages. En réponse aux UV, des niveaux élevés de p53 sont détectés ainsi qu'une augmentation de p21, une des cibles transcriptionnelles de p53.

Il est tout à fait possible que p16<sup>INK4a</sup> puisse agir pour supprimer l'hyperprolifération de l'épiderme induite par une exposition aux rayons ultraviolets et maintenir ainsi l'homéostasie de l'épiderme (Ahmed et al., 1999).

L'induction de p16<sup>INK4a</sup> suite aux rayonnements UV semble prendre place à un niveau post-transcriptionnel et est observé durant les réponses immédiates et adaptatives des kératinocytes aux UV. Cette augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> semble être caractéristique des rayons ultraviolets car quand les cultures sont traitées avec des radiations ionisantes, il ne semble pas y avoir d'augmentation de l'expression de cette protéine (Chazal et al. 2002).

#### 3.1.2 p16 et les tumeurs de la peau

##### 3.1.2.1 p16 et les tumeurs malignes

Dans un bon nombre de cancers, le gène codant pour la protéine p16 est délété ou muté. Parmi ces cancers, on retrouve notamment: les leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée T, les mélanomes familiaux et sporadiques, les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes pancréatiques, les carcinomes des poumons et de la vessie (Chin et al., 1998).

- p16<sup>INK4a</sup> dans les carcinomes épidermoïdes

## Introduction

Le carcinome épidermoïde de la peau dérive des kératinocytes de la couche basale et est le second cancer le plus commun chez les caucasiens. L'incidence de la maladie a rapidement augmenté en Europe, dans le nord de l'Amérique et en Australie.

Ces cancers montrent souvent une surexpression de p16<sup>INK4a</sup> en immunohistochimie (Figure 1-14).

La plupart des cas de carcinomes épidermoïdes s'observent sur des zones de peau exposées de manière chronique aux rayonnements ultraviolets.

Les carcinomes épidermoïdes peuvent se développer aussi à partir de blessures chroniques, de cicatrices, de brûlures, ou d'ulcères (Brown et al., 2004).

Les altérations pouvant affecter le gène de p16<sup>INK4a</sup> incluent des petites délétions dans le gène ainsi que l'hyperméthylation du promoteur de p16<sup>INK4a</sup> et plus rarement des mutations dans le locus INK4A/ARF (Nilsson et al., 2004).

- p16 dans la maladie de Bowen

Parmi les cancers de la peau, la maladie de Bowen des organes génitaux et des doigts est en général associée avec une infection aux papillomavirus de haut risque, spécialement les HPV de type 16.

Cliniquement, la maladie de Bowen est habituellement présentée comme une plaque érythémateuse parfois recouverte d'une croûte. Toutes les cellules tumorales montrent un marquage fort et diffus de p16 dans le noyau et dans le cytoplasme (figure 1-15) (Murao et al., 2005).

Récemment, des HPV ont été découverts dans d'autres localisations de cette maladie, comme par exemple sur la plante des pieds. La lésion de la plante de pied fut excisée et examinée. Une hyperkératose, une acantose et une papillomatose furent décelées. Des kératinocytes atypiques sont distribués de manière irrégulière dans l'épiderme et montrent un noyau hyperchromatique ainsi qu'un regroupement de la chromatine nucléaire. Des mitoses de formes normales et anormales sont observées dans toute l'épaisseur de la lésion.

Dans la lésion, une hyperpigmentation est observée au niveau de la couche basale. Il n'y a pas d'invasion dermique. L'expression de la protéine p16<sup>INK4a</sup> fut examinée dans les lésions par analyse immunohistochimique.

Ils ont alors posé l'hypothèse que l'expression immunohistochimique de p16<sup>INK4a</sup> pourrait être un marqueur sensible et spécifique de la maladie de Bowen et être ainsi d'une aide précieuse pour compléter un diagnostic histomorphologique (Salama et al., 2003).

### 3.1.2.2 Les tumeurs bénignes

- p16 dans la kératose séborrhéique

La kératose séborrhéique est une maladie commune de la peau associée au vieillissement. Elle se développe chez les individus âgés, dans les deux sexes suite à une exposition excessive à la lumière. Elle pose des problèmes cosmétiques aux personnes âgées mais est considérée comme une lésion inoffensive car ce n'est que très rarement qu'une tumeur maligne se développe à partir de ces lésions.

## Introduction

p16<sup>INK4a</sup> est exprimé dans le noyau et le cytoplasme des cellules kératosiques, tandis que dans les cellules normales adjacentes à la lésion, p16<sup>INK4a</sup> s'il est exprimé, ne l'est que dans le noyau des cellules de la couche granuleuse.

Les cellules formant les lésions de la kératose séborrhéique expriment très fortement p16<sup>INK4a</sup>. Cette expression reflète la pathogénicité des lésions séborrhéiques et la sénescence des kératinocytes (Nakamura et al., 2003).

## 3.2 p16 et la sénescence cellulaire

### 3.2.1 p16 et la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire consiste en la perte du potentiel prolifératif des cellules après l'accumulation d'un nombre de doublements de population caractéristique de chaque espèce. Durant le vieillissement, les cellules ne prolifèrent plus et les tissus perdent leur capacité de régénération.

Un bon nombre de stimuli ont été identifiés comme induisant la sénescence cellulaire comme par exemple le raccourcissement des télomères, les dommages à l'ADN, les stress oxydatifs et encore bien d'autres. La sénescence induite par le raccourcissement des télomères est appelée sénescence répllicative et est le résultat de dommages à l'ADN causé par des signaux générés par des télomères dysfonctionnels. D'autres mécanismes peuvent aussi induire la sénescence indépendamment du raccourcissement des télomères ; on parle alors de sénescence prématurée. Celle-ci peut résulter de l'activation de voies de signalisation mitogènes telles que Ras, Raf ou MEK ainsi qu'à la surexpression du facteur de transcription E2F. Les mécanismes menant à l'induction de la sénescence prématurée sont moins bien connus que ceux de la sénescence répllicative. Cependant, le phénotype caractéristique et les signaux moléculaires de ces deux types de sénescence semblent être très similaires (Satyanarayana et al., 2004).

L'étude de la sénescence cellulaire et de ses aspects liés à l'extension de la durée de vie et à l'immortalisation dans les cellules en culture devient un système d'une grande valeur pour comprendre la tumorigenèse. La sénescence cellulaire dépend d'un bon nombre de voies de signalisation qui ensemble conduisent à l'arrêt permanent et irréversible du cycle cellulaire (Bringold et al., 2000).

Durant la sénescence, les cellules sont arrêtées en phase G1. Les cellules exhibent alors une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de p53 et une surexpression des inhibiteurs du cycle cellulaire p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p16<sup>INK4a</sup> apparaissant peu de temps après l'activation de p21 (Huschtscha et al., 1999).

p16<sup>INK4a</sup> est depuis longtemps reconnu comme étant un acteur de la sénescence. Il lie et induit une modification allostérique de conformation dans CDK4/CDK6, ce qui inhibe la liaison à l'ATP et réduit de cette manière la formation d'une interface CDK4/CDK6-cycline D, ce qui mène à la « disruption » de l'interaction avec les cyclines de type D. Cet antagonisme de liaison de la cycline et d'activation des CDK a pour effet de maintenir la protéine pRb dans son état hypophosphorylé ce qui supprime la croissance cellulaire et arrête le cycle cellulaire. Chez les humains, un dysfonctionnement des télomères induit la sénescence en activant les protéines p53 et p16 (Satyanarayana et al., 2004).

De manière tout à fait intéressante, des cellules exprimant l'antigène T du virus SV40 par exemple, accumulent des taux de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>WAF1/CIP1</sup> tout à fait semblables aux cellules normales, sans que ces cellules n'entrent en sénescence. Cela suggère que la surexpression de p16<sup>INK4a</sup> et p21<sup>WAF1/CIP1</sup> n'est pas la cause de l'entrée en sénescence mais est plutôt lié à



## Introduction

l'accumulation du nombre de doublements de population. De plus, la perte de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> facilite l'immortalisation dans plusieurs systèmes cellulaires.

Au contraire de la sénescence cellulaire, le vieillissement est un processus qui se produit au niveau de tout l'organisme et qui implique probablement plus de facteurs que la simple accumulation de doublements de population (Serrano, 1997).

La restriction calorique retarde le vieillissement pour un bon nombre d'espèces mais les effecteurs moléculaires impliqués ne sont pas encore connus. L'expression de p16 n'est pas étroitement liée avec le vieillissement mais est influencée par la restriction calorique et corrélée avec l'expression de SA- $\beta$  galactosidase est utilisée comme marqueur de la sénescence cellulaire. Quand les cellules sont jeunes, quand elles ont un faible nombre de doublements de population, l'activité SA- $\beta$  galactosidase n'est pas détectée ; par contre, lorsque les cellules entrent en sénescence, cette activité est détectée (Krishnamurthy et al., 2004).

### 3.2.2 Les cellules hTERT

Les cellules somatiques humaines ont une capacité limitée de réplication en culture même si les conditions requises pour leur nutrition et leur réplication sont réunies. L'érosion de l'ADN télomérique avec les réplications successives a conduit à la proposition que les télomères ne fonctionnent pas seulement pour protéger les chromosomes mais aussi pour signaler le début de la sénescence quand ils se raccourcissent.

La plupart des cellules cancéreuses expriment l'enzyme télomérase. Cette enzyme est une ribonucléoprotéine multimérique contenant une composante ARN qui inclut dans sa séquence le « template » pour la synthèse du télomère et une sous unité protéique catalytique qui est une reverse transcriptase.

L'expression de la télomérase dans les cellules cancéreuses immortelles est apparemment responsable du maintien d'une longueur stable des télomères et ce via un nombre indéfini de divisions cellulaires (figures 1-16 et 1-17).

Bien que la composante ARN de la télomérase soit exprimée de manière constitutive, la sous-unité catalytique, hTERT, est exprimée seulement dans les cellules germinales et dans les cellules cancéreuses immortalisées suggérant que hTERT est la composante limitant l'activité de la télomérase. L'introduction de hTERT dans des fibroblastes humains présénescents leur confère le maintien des télomères et illimite leur potentiel réplicatif. Cependant, dans les kératinocytes humains normaux et dans les cellules épithéliales mammaires, l'expression de hTERT n'est pas suffisante pour l'immortalisation.

Dans les kératinocytes, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est associée à la sénescence et est totalement indépendante du raccourcissement des télomères. Les kératinocytes qui expriment hTERT et qui ont perdu l'expression de p16<sup>INK4a</sup> deviennent immortels mais gardent les caractéristiques normales de croissance et leur potentiel de différenciation. Cette observation suggère que le processus de sénescence dans ces cellules est complexe mais séparé des mécanismes qui régulent la croissance et la différenciation cellulaire (Dickson et al., 2000).

Les cellules hTERT sont des kératinocytes épidermiques humains immortalisés. Ces kératinocytes proviennent de la lignée POE9n, une lignée de kératinocytes buccaux issus d'une lésion dysplasique précancéreuse, qui ont été infectés avec un vecteur rétroviral encodant la sous-unité hTERT de la télomérase. Dans les cellules infectées, une activité de la télomérase est clairement détectable par rapport aux cellules contrôles non infectées et les télomères des cellules infectées sont maintenus plus longs que ceux des cellules contrôles. Pour devenir immortels, ces kératinocytes ont encore dû perdre p16<sup>INK4a</sup>.

## Introduction

Les cellules hTERT sont donc des cellules surexprimant la télomérase et ayant perdu p16<sup>INK4a</sup>. Ces cellules bien que devenues immortelles, conservent leurs systèmes majeurs de contrôle de la croissance et de la différenciation (Dickson et al., 2000).

### 3.2.3 Ras, un oncogène qui induit la sénescence

Ras oncogénique représente le standard des proto-oncogènes. La famille de Ras proto-oncogène code pour des petites protéines liant le GTP.

Ras est un point de convergence de nombreux stimuli mitogènes extracellulaires. L'activation de ras a lieu au niveau de la membrane suite au recrutement de récepteurs aux facteurs de croissance via des protéines de couplages tels que Shc (reconnaissant des sites tyrosines spécifiquement phosphorylés). Tout comme de nombreux stimuli externes aboutissent à l'activation de Ras, il existe également de nombreux de stimuli internes qui découlent de cette activation. De cette manière, Ras active des voies de signalisation qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, la génération de stress oxydatifs et dans le changement du cytosquelette. En particulier, la cascade de MAPK (mitogen activated protein kinases) formée par les kinases Raf/Mek/Erk qui est essentielle pour la prolifération. Une autre cible importante de Raf est la PI3K (phosphatidylinositol 3 phosphate kinase). Le rôle de Ras dans le cycle cellulaire n'est pas circonscrit à la transition de l'état de quiescence des cellules à l'état de prolifération mais Ras intervient également à d'autres étapes du cycle. L'activité la plus importante de Ras en phase G1 semble être la phosphorylation de pRb. Ras déclenche la phosphorylation de pRb par un mécanisme qui implique la surexpression de la cycline D1 et la diminution de l'expression de p27<sup>KIP1</sup>. Bien que l'effet initial de Ras oncogénique dans les cellules normales soit de déclencher la prolifération, Ras oncogène induit la sénescence suite à une prolifération aberrante après un certain nombre de doublements de population. En contraste avec son activité mitogène, l'expression de Ras oncogénique est normale dans les cellules en sénescence prématurée. Cette sénescence induite par Ras est accompagnée d'une surexpression de p16<sup>INK4a</sup> et de p14<sup>ARF</sup> et de l'activation subséquente de pRb et de p53.

L'activation de Ras est une étape cruciale de la tumorigénèse. La transformation néoplasique par Ras oncogénique ne se manifeste seulement que si la réponse de sénescence prématurée n'a pas lieu (Bringold, Serrano, 2000).

L'interaction entre Ras et Raf mène à l'activation séquentielle de MAPK, MEK1 et MEK2 et de MAPKs ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinase). ERK1 et ERK2 actifs induisent la prolifération cellulaire.

La capacité de Ras oncogénique d'induire la sénescence dépend de la voie de signalisation Raf-MEK-ERK qui dirige la prolifération cellulaire (W.Wang et al., 2002)(figure 1-18).

### 3.3 Kératinocytes, p16 et human papillomavirus

Les HPV sont des petits virus à ADN, constitués de 8000 paires de bases organisées en une double chaîne circulaire, super-enroulée et associée à des histones. Ces virus ne comportent pas d'enveloppe mais sont entourés d'une capsid de plus ou moins 55nm de diamètre ayant une structure icosaédrique et contenant exclusivement des protéines virales.

Il existe à ce jour plus de 100 génotypes de papillomavirus répertoriés infectant l'espèce humaine.

L'organisation génomique des papillomavirus est bien conservée. Un seul des brins d'ADN est codant mais il peut être lu dans les trois cadres de lecture.

Trois régions sont à distinguer :

- early control region (E);
- late control region (L);
- long control region (LCR).

Dans la région précoce (E) se trouve le potentiel de transformation et d'immortalisation des HPV. Cette région contient également un nombre de gènes régulateurs nécessaires à la transcription virale, la réplication et le contrôle du cycle cellulaire. Ces sont les gènes E1 à E7.

Les gènes de la région tardive, L1 et L2 sont des gènes de capsid.

LCR contient tous les éléments régulateurs nécessaires pour la transcription de HPV incluant le promoteur précoce et l'origine de réplication (figure 1-19).

Les HPV (Human Papilloma Virus) induisent des tumeurs bénignes et malignes en infectant les kératinocytes des épithéliums pavimenteux stratifiés (peau, muqueuses ano-génitales, muqueuses oro-laryngées,...)

Il existe des HPV de faible risque ne conduisant pas à la formation de cancers (HPV6 et HPV11 par exemple) et les HPV de haut risque qui induisent à la formation de cancers (HPV16 et HPV18, par exemple).

Depuis bien longtemps, le lien entre les cancers du col de l'utérus et les HPV est connu.

En effet, dans la plupart de ces cancers, l'ADN de certains types de papillomavirus humains est retrouvé. Les HPV oncogènes exprimés dans les cellules cancéreuses sont impliqués dans leur transformation ainsi que dans leur immortalisation et sont requis pour la progression de la malignité.

Le cycle de vie des papillomavirus diffère de celui des autres familles de virus. En effet, l'infection requiert la disponibilité des cellules de la couche basale c'est-à-dire de cellules qui sont capables de proliférer et de se différencier. Dans ces cellules, l'expression des gènes viraux est largement réprimée, bien que l'expression limitée des gènes précoces spécifiques tels que E5, E6 et E7 améliore la prolifération des cellules infectées ainsi que leurs expansions latérales. En entrant dans les couches suprabasales (couches épineuse, granuleuse et cornée), les gènes viraux tardifs sont exprimés, le génome viral circulaire est répliqué et des protéines structurales formées. Dans les couches supérieures de l'épiderme ou des muqueuses, les particules virales complètes sont assemblées et larguées (figure 1-20).

Dans le cas d'une infection bénigne du col de l'utérus, le virus pénètre via des micro-lésions pour atteindre les cellules de la couche basale de l'épithélium. Là, il se maintient sous forme épisomale et est répliqué grâce aux protéines E1 et E2. Après division cellulaire, une des cellule reste au niveau de la couche basale et l'autre migre vers la couche épineuse et commence à se différencier. Cette différenciation sans division constitue un problème pour le virus. En effet, il a besoin de la machinerie cellulaire de réplication de l'hôte pour la synthèse de son ADN. Durant cette différenciation, le virus stimule la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S dans la cellule hôte. Cela a pour effet de maintenir un niveau

## Introduction

adéquat les enzymes nécessaires à sa réplication car une cellule différenciée ne contient que peu ou pas d'enzymes de réplication.

La différenciation de la cellule hôte entraîne l'initiation de l'expression des gènes viraux tardifs codant pour les protéines formant la capsidie des papillomavirus. Au niveau de la couche cornée, les particules virales sont assemblées avant d'être larguées dans l'environnement.

Dans le cas des lésions évoluant vers un cancer, le génome circulaire de HPV est rompu et il s'intègre dans le génome de la cellule hôte. Avec cette intégration, le génome de HPV perd la région codant pour la protéine E2 ainsi que les ORF adjacentes à E2, c'est-à-dire E4, E5 et une partie de L2. Cette intégration est une étape irréversible conduisant à la transformation maligne (figure 1-21). De nombreuses questions subsistent quant aux processus intervenant dans la linéarisation et l'intégration de HPV dans l'ADN de l'hôte (Harald zur Hausen, 2002).

### 3.3.1 Notes sur certains gènes de HPV

#### 3.3.1.1 Le gène de E2

Ce gène code pour une protéine hautement phosphorylée de 48kDa. E2 régule la transcription virale et la réplication à travers des interactions avec une région partiellement palindromique de la LCR. Dans les HPV-16 et les HPV-18, la protéine E2 réprime le promoteur de E6 et E7. Quand HPV-16 s'intègre dans le chromosome de sa cellule hôte, les gènes E1 et E2 sont scindés et la répression des protéines oncogènes E6 et E7 est levée.

#### 3.3.1.2 Le gène de E6

Les protéines E6 des HPVs sont de petites protéines de plus ou moins 150 acides aminés caractérisées par 4 motifs Cys-X-X-Cys pouvant former des motifs en doigts de zinc.

E6 est l'un des premiers gènes exprimés durant l'infection par HPV16. E6 ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque mais exerce ses fonctions en agissant sur de multiples protéines cellulaires.

Durant l'infection par HPV, E6 joue de multiples rôles. Il interfère avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire dans le but de créer un environnement favorable à la réplication de l'ADN viral tout en neutralisant les contrôles de surveillance de la cellule qui sont activés dans les cellules infectées.

p53 constitue le principal obstacle à la réplication virale car elle peut entraîner l'arrêt du cycle cellulaires ou l'apoptose des cellules infectées. Les protéines E6 des HPVs à haut risque bloquent donc l'apoptose en inhibant p53, laissant ainsi la cellule sans protection vis-à-vis des effets sur l'instabilité génomique.

L'interaction de E6 avec p53 a pour effet de moduler la stabilité de celle-ci. En conditions normales de croissance, la dégradation de p53 est contrôlée via un processus mettant en jeu le protéasome par l'entremise de la protéine ubiquitine-ligase MDM2.

Pour dégrader p53, E6 recrute la protéine E6AP (E6-associated protein) qui est une protéine E3 ubiquitine-ligase qui accepte l'ubiquitine d'une enzyme E2 de conjugaison (E2 ubiquitin-conjugating enzyme) sous la forme d'un thioester et puis qui transfère directement cette ubiquitine au substrat cible, p53.

## Introduction

En plus, l'activation de la télomérase et l'inhibition de la dégradation des kinases de la famille SRC par l'oncoprotéine E6 semblent accomplir d'importantes fonctions dans la stimulation de la croissance.

E6 inhibe la différenciation terminale et la sénescence, donc stimule l'immortalisation de la cellule (figure 1-22).

p16<sup>INK4a</sup> semble contrecarrer ces fonctions (Harald zur Hausen, 2002).

### 3.3.1.3 Le gène de E7

La protéine E7 est un petit polypeptide acide qui est composé d'environ 100 acides aminés selon les types d'HPV et qui présente deux motifs Cys-X-X-Cys impliqués dans sa dimérisation et nécessaires à son activité transformante. Elle contient aussi deux domaines d'homologies avec les protéines adénovirales E1A et l'antigène T de SV40 dont un domaine de fixation à pRb.

Les protéines E7 se retrouvent principalement dans le noyau.

Le génome d'HPV ne code que pour quelques-unes des fonctions nécessaires à sa réplication, et dépend donc largement de la machinerie cellulaire de l'hôte pour ce processus.

De nombreux facteurs de réplication de la cellule hôte sont sous le contrôle de facteurs de transcription appartenant à la famille E2F. Ces facteurs de transcription régulent l'expression des facteurs de réplication.

E7 interagit avec pRb et le dégrade, ce qui a pour effet de relarguer le facteur de transcription E2F et de surexprimer p16<sup>INK4a</sup>. La libération de E2F a pour conséquence de permettre l'entrée en phase S du cycle cellulaire. E7 stimule des gènes de la phase S du cycle cellulaire, la cycline A et la cycline E et semble bloquer les fonctions des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines p21<sup>WAF1</sup> et p27<sup>KIP1</sup>.

La perturbation des processus dépendant de E2F par E7 s'effectue principalement au niveau de la protéine du rétinoblastome, pRB. Cette perturbation prend la forme d'une dégradation de pRB entraînée par son interaction avec E7 et la mise en œuvre du protéasome. E7 a une durée de vie très courte et sa voie de dégradation est une voie ubiquitine-protéasome. E7 pourrait donc entraîner avec elle la protéine du rétinoblastome.

La dégradation de pRB a pour conséquence de libérer le facteur de transcription E2F et ainsi de permettre l'entrée en phase S. En effet, dans une cellule, l'interaction des « pocket proteins » pRB avec E2F inhibent l'action de celles-ci (figure 1-22 et figure 1-23) (Harald zur Hausen, 2002).

## 3.4 Les cellules E6E7

E6 et E7 peuvent, indépendamment l'un de l'autre, immortaliser des cellules humaines mais avec une efficacité réduite. Par contre, quand leurs fonctions se cumulent, il en résulte une augmentation marquée de cette activité. Cela semble être dû à un effet complémentaire et synergique. E6 semble être contrecarré par INK4a mais E7 passe au dessus de cette inhibition en activant directement les cyclines A et E. E6 prévient l'apoptose induite par E7 en dégradant les protéines qui conduisent à l'apoptose p53 et BAK (Figure 1-25)(Harald zur Hausen, 2002).

Les cellules E6E7 nous ont été fournies par Mark Pittelkow. Ce sont des kératinocytes ayant été transfectés avec des plasmides : pE7, pSDE6 et pHaLTR.

## Introduction

Le plasmide pE7 exprime la protéine E7 de HPV16 sous le contrôle du LTR du virus du sarcome de Harvey. pSDE6 exprime la protéine E6 de HPV16 sous le contrôle du même LTR. Le plasmide pHaLTR contient le promoteur.  
(Barbosa et al., 1990; Sedman et al., 1991). Ces cellules sont devenues immortelles.

## 4. Objectif du mémoire

Les données de la littérature, mais également des résultats préliminaires obtenus au Laboratoire Cellules et Tissus (LabCeTi) ainsi qu'à l'Institut de Pathologie et de Génétique, suggèrent une implication de p16<sup>INK4a</sup> dans la différenciation de kératinocytes épidermiques *in vitro*, mais pas *in vivo*, en tout cas en conditions physiologiques. Par ailleurs, une telle régulation (ou dérégulation ?) est observée dans les tumeurs malignes dérivées des kératinocytes.

Disposant au LabCeTi d'un modèle de différenciation épidermique autocrine *in vitro*, nous avons décidé de l'appliquer à l'étude d'une éventuelle régulation de p16<sup>INK4a</sup> par la différenciation tant au niveau transcriptionnel que traductionnel.

Cette approche principale est assortie de deux questions "accessoiries" concernant d'une part, l'expression tant cytoplasmique (surprenante) que nucléaire (attendue) de p16<sup>INK4a</sup> dans notre modèle et, d'autre part, la réponse de p16<sup>INK4a</sup> aux UV qui ne nous apparaît pas très claire dans les données actuelles de la littérature. La localisation de p16<sup>INK4a</sup> sera abordée par microscopie confocale et par centrifugation des compartiments cellulaires. La réponse aux UV sera étudiée aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, à partir de notre modèle et sur base de protocoles développés à l'URBC.

# Matériel et méthodes



## 1. Culture de kératinocytes épidermiques humains

### Matériel utilisé :

#### Milieu complet KGM-2

(Keratinocyte Growth Medium)

- KBM-2 (Keratinocytes Basal Medium, Clonetics)
- À cela, on ajoute différents suppléments:
  - BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%
  - HEGF (human Epidermal Growth Factor) 0,2ng/ml
  - Hydrocortisone  $5 \times 10^{-7}$  M
  - Epinéphrine
  - Transferrine 5µg/ml
  - Streptomycine 50µg/ml
  - Pénicilline G 50unités/ml

#### Milieu complet Epilife +

Epilife Medium® (cascade)

A ce milieu de base, on ajoute différents suppléments :

- HKGS ( Human Keratinocyte Growth Supplement):
  - BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%
  - HEGF (human Epidermal Growth Factor) 0,2ng/ml
    - Hydrocortisone  $5 \times 10^{-7}$  M
  - Transferrine 5µg/ml
- Streptomycine 50µg/ml (0,1%)
- Pénicilline G 50unités/ml (0,1%)

#### Milieu Epilife -

Epilife Medium® (cascade)

auquel on ajoute:

- Acides aminés:
  - L-Histidine  $2,4 \times 10^{-4}$  M
  - L-Isoleucine  $7,5 \times 10^{-7}$  M
  - L-Méthionine  $9 \times 10^{-4}$  M
  - L-Phénylalanine  $9 \times 10^{-4}$  M
  - L-Tryptophane  $4,5 \times 10^{-4}$  M
  - L-Tyrosine  $7,5 \times 10^{-4}$  M
- Hydrocortisone  $5 \times 10^{-7}$  M
- Streptomycine 50µg/ml
- Pénicilline G 50unités/ml

#### Solution A

- glucose 10mM
- KCl 3mM
- NaCl 130mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1mM
- Rouge phénol 0,0033mM
- HEPES 30mM
- pH 7,4
- Stérilisation par filtration sur Stérivex- GV 0,22µm

#### Trypsine T17 (Trypsine de pancréas bovin)

- Solution A
- Trypsine à 0,17%

#### Trypsine T25

- Solution A
- Trypsine 0,025%
- Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA) 0,01%

#### Solution dFCS 2%

- Solution A
- Serum de veau foetal dialysé (dFCS) à 2% (le sérum est dialysé contre un tampon sans  $\text{Mg}^{2+}$  et sans  $\text{Ca}^{2+}$ )

#### Milieu de congélation

- Milieu complet Epilife + à 60%
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 20%
- dFCS à 20%

### Méthode :

#### 1.1 Mise en culture primaire

Les kératinocytes utilisés pour la mise en culture primaire sont obtenus à partir d'abdominoplasties réalisées à la clinique Saint-Luc de Bouge. Dès que l'opération est terminée, les couches superficielles de la peau excédentaire, c'est-à-dire le derme et l'épiderme, sont prélevées à l'aide d'un dermatome et conservées en conditions stériles dans une solution physiologique jusqu'à l'arrivée au laboratoire. A partir de ces prélèvements de peau, une souche de kératinocytes abdominaux normaux est établie (NAK). Toutes les manipulations au laboratoire se déroulent en conditions stériles sous une hotte à flux vertical.

Les lambeaux de peau sont découpés en petits carrés de plus ou moins 1 cm<sup>2</sup> à l'aide de bistouris stériles. A ce stade, la jonction épidermo-dermique est toujours bien présente. A l'aide de trypsine de pancréas bovin 0,17% (T17), le derme est séparé de l'épiderme. Pour ce faire, les petits carrés de peau sont déposés dans la solution de trypsine T17 face dermique dans la solution pendant une nuit à une température de 4°C.

Après une nuit, l'épiderme est séparé du derme et déposé dans une solution de sérum de veau foetal à 2% pour bloquer l'action de la trypsine T17.

Les kératinocytes épidermiques vont alors être détachés les uns des autres grâce à des frottements successifs avec des pinces ainsi que le passage à travers d'une pipette. La solution contenant les cellules est alors passée sur un tamis de 70 µm pour éliminer les cellules de la couche cornée ainsi que les cellules non dissociées.

La suspension cellulaire est alors récupérée et centrifugée à 1000rpm (182g) à 4°C pendant 10 minutes.

Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du milieu de culture KGM-2 contenant tous les facteurs de croissance et toutes les hormones nécessaires à la prolifération des kératinocytes. L'ajout de 0,1% dFCS au milieu KGM-2 permet une adhérence plus facile des kératinocytes au substrat.

Les kératinocytes sont à ce stadeensemencés à une très forte densité, c'est-à-dire 46000 cellules par cm<sup>2</sup>.

Une foisensemencées, les boîtes de culture contenant les kératinocytes sont mises dans un incubateur (37°C, taux d'humidité constant et 5% de CO<sub>2</sub>).

Le premier changement de milieu se fait 4 jours après la mise en culture et ensuite, il est changé tous les deux jours.

#### 1.2 Culture secondaire

La mise en culture secondaire a pour but d'amplifier de manière importante le nombre de cellules.

Dans le but d'obtenir une culture secondaire conservant tout le potentiel prolifératif des cellules, il est important de passer les cellules de la culture primaire avant qu'elles n'atteignent le stade de la confluence et qu'elles n'entament leur processus de différenciation.

Pendant leur phase proliférative, c'est-à-dire durant la sous-confluence, les cellules sont détachées du fond de la boîte de culture, à l'aide de trypsine T25. Cette solution contient de la trypsine (0,025%) ainsi qu'un agent chélateur de calcium qui est l'EDTA (0.01%). Une fois que les cellules sont bien détachées du fond de la boîte de culture, une solution bloquante contenant de la solution A et% du sérum de veau foetal dialysé est ajoutée afin de stopper l'action de la trypsine.

## Matériel et méthodes

Les cellules sont ensuite récoltées, centrifugées, comptées etensemencées (10000 cellules par  $\text{cm}^2$ ).

Les kératinocytes sont connus pour leur capacité à adhérer très fort à leur substrat. C'est d'ailleurs grâce à cette propriété qu'ils vont pouvoir être séparés d'autres types cellulaires. Afin d'éliminer les autres types cellulaires, la culture est placée dans une solution de trypsine T25. Après 5 minutes dans cette solution, elle est aspirée et avec elle tous les types cellulaires autres que les kératinocytes. Pour détacher les kératinocytes du fond de la boîte, la trypsinisation doit durer un temps beaucoup important.

Les kératinocytes détachés sont remis en culture secondaire dans du milieu reconstitué EpiLife + ayant une faible teneur en calcium (0,06mM) et contenant tous les facteurs de croissance ainsi que les hormones nécessaires à la prolifération des kératinocytes épidermiques.

### 1.3 Congélation de cellules

Quand les cellules de la culture secondaire sont en phase de prolifération, les cellules sont congelées afin de pouvoir effectuer des remises en culture tertiaires. Cette culture tertiaire permettra de faire toutes les manipulations nécessaires.

Pour cela, les cellules doivent être détachées de leur substrat grâce à de la trypsine T25. Une fois que celle-ci a détaché les cellules, la solution bloquante est ajoutée. Le tout est récolté dans un tube, centrifugé, resuspendu dans du milieu Epilife + et ensuite compté.

Une fois que le nombre de cellules est connu, la solution de congélation (60% de milieu Epilife +, 20% Diméthylsulfoxyde (DMSO), 20% dFCS) est ajoutée au tube contenant les cellules se trouvant dans le milieu Epilife +.

Les cellules sont ensuite aliquotées dans des cryotubes NUNC de 1,5ml soit à  $2 \cdot 10^6$  cellules par ml soit à  $1 \cdot 10^6$  cellules par ml. Une fois dans les tubes, les cellules sont congelées à  $-80^\circ\text{C}$  pendant au minimum une nuit et au maximum une semaine, après quoi, les tubes sont transférés dans l'azote liquide à  $-180^\circ\text{C}$  permettant une conservation sur de très longues périodes.

### 1.4 Culture tertiaire

Les cellules contenues dans les cryotubes sont sorties de l'azote et décongelées dans un bain-marie à  $37^\circ\text{C}$ .

Une fois qu'elles sont décongelées, il est important de placer les tubes sur de la glace afin de maintenir les cellules à une température de  $4^\circ\text{C}$  afin de conserver leur viabilité. Le contenu des différents tubes est rassemblé dans un seul et les cellules sont comptées.

La mise en culture tertiaire se fait dans du milieu KGM-2 à une densité variant entre 6000 et 10.000 cellules par  $\text{cm}^2$ . Le lendemain, le milieu KGM-2 est remplacé par du milieu Epilife + afin d'éliminer les traces de DMSO provenant du milieu de congélation.

Une fois que les kératinocytes occupent plus ou moins 50% de la boîte de culture, le milieu Epilife + est remplacé par du milieu Epilife - ne contenant plus de facteurs de croissance mais seulement des acides aminés et de l'hydrocortisone. La culture est dite autocrine car les kératinocytes sécrètent eux-mêmes leurs propres facteurs de croissance.

Le milieu de culture est changé tous les deux jours et les kératinocytes passent successivement par les différents stades de culture qui sont la sous-confluence, la confluence et la post-confluence.

## Matériel et méthodes

Les cellules sont dites à sous-confluence quand elles occupent 80% de la surface de la boîte de culture et de nombreuses mitoses sont observées. Les cellules sont à confluence quand il n'y a plus d'espace entre elles, quand elles sont collées les unes aux autres et qu'il n'y a plus de mitoses observées. Et la post-confluence est obtenue 4 jours après la confluence.

## 2. Traitement des kératinocytes aux UV

### Matériel utilisé

Tampon PBS 1X concentré stérile:

PBS :

- KCl 2mM
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4mM
- NaCl 0.13M
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8mM
- pH 7.2
- $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.1mM

### Méthode

Le tampon PBS est stérilisé par filtration sur Stérivex- GV 0,22 $\mu\text{m}$ . La culture cellulaire est rincée une fois à l'aide de 15 ml de tampon PBS à pH 7,4. Les cellules sont alors mises dans 10ml de PBS et les boîtes sont placées sous la lampe à UV (néon Philips TM x200Ls, 230V, 50Hz). Les UV utilisés sont des UVB (320nm). La longueur d'onde utilisée est 320nm. La dose reçue par les kératinocytes, mesurée grâce à un capteur (VLX 3 W, n°9945-3W, made in France), est de 500mJ/cm<sup>2</sup>, 300mJ/cm<sup>2</sup>, ou 150mJ/cm<sup>2</sup> selon l'expérience.

Une fois les cellules irradiées, elles sont replacées dans du milieu Epilife - . Les ARNms sont extraits 6h, 12h et 24h après le traitement aux UV.

### 3. Extraction et concentration d'ARNmessagers (ARNm)

#### Matériel utilisé:

##### H<sub>2</sub>O traitée DEPC

- 500ml d'H<sub>2</sub>O
- 0,1% de diéthyl pyrocarbonate (DEPC)
- + autoclave

##### Lysis buffer (tampon de lyse)

- Tris-HCl 0,01M
- NaCl 0,1M
- EDTA 0,0002M
- SDS (sodium dodécyl sulfate) 1%
- 0,1% de DEPC
- + autoclave

##### High Salt Buffer (tampon riche en sels)

- Tris-HCl 0,01M
- NaCl 0,5M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2%
- 0,1% de DEPC
- + autoclave

##### Low Salt Buffer (tampon pauvre en sels)

- Tris-HCl 0,01M
- NaCl 0,1M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2%
- 0,1% de DEPC
- + autoclave

##### No Salt Buffer (tampon sans sel)

- Tris-HCl 0,005M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2%
- 0,1% de DEPC
- + autoclave

##### Tampon TE

- Tris base 9mM
- EDTA - 2 H<sub>2</sub>O 0,9mM
- pH 8

#### Méthode :

##### 3.1 Préparation d'oligo-dT couplés à de la cellulose

Pour isoler les ARNm, des oligo-dT monobrins s'appariant à leur queue de polyA sont utilisés. Cet appariement a lieu en présence d'une forte concentration en sels. Pour une boîte de culture de 75cm<sup>2</sup>, 0,025g d'oligo-dT sont nécessaires et pour une boîte de 175 cm<sup>2</sup>, il en faut 0,05g. La séquence d'oligo dT est constituée de 30 bases de désoxythymidines. Cette chaîne de nucléotides est attachée à la cellulose en 5' phosphate (Oligo(dT)cellulose, Invitrogen). Les ARNm sont très fragiles, afin d'éviter leur dégradation, les oligo-dT sont traités au DEPC avant utilisation.

Afin d'enlever les particules de cellulose qui pourraient boucher la colonne d'élution, les oligos sont traités deux fois avec du NaOH 0.1M. Ensuite, un lavage de 30 minutes dans une solution d'eau traitée avec 0.1% de DEPC est effectué. Une fois ce rinçage terminé, les oligo-dT sont encore lavés trois fois avec de l'eau traitée au DEPC et une fois avec du tampon riche en sels.

Une fois tous ces rinçages terminés, les oligo-dT sont remis en suspension dans 2 ml de ce tampon riche en sels.

La suspension d'oligo-dT ainsi préparée se conserve une semaine à 4°C.

##### 3.2 Extraction d'ARN

L'extraction des ARNm des cultures cellulaires est effectuée à partir du protocole mis au point par Schwab et al. en 1983.

## Matériel et méthodes

Le milieu de culture est retiré et le tampon de lyse est déposé dans la boîte très rapidement afin d'éviter que des RNAses endogènes ne s'activent et ne dégradent les ARNm.

Ce tampon de lyse contient 25µg/ml de protéinase K (Roche). Cette dernière inactive les RNAses et les DNAses non spécifiques.

Le lysat cellulaire un peu visqueux est fluidifié par le passage dans une seringue avec aiguille stérile de calibre 21G (Braun) ce qui permet de casser la structure globulaire de l'ARN.

La concentration en protéinase K est ajustée à 75µg/ml et le tout est incubé pendant 30 minutes à 37°C pour permettre à la protéinase K d'agir de manière optimale.

Une fois l'incubation terminée, la concentration en sels est augmentée de 0.1 M à 0.5 M pour que les bonnes conditions soient réunies pour l'hybridation des polyA et des oligos-dT. Le lysat cellulaire est mis en présence des oligos-dT au préalable préparés et l'hybridation se fait pendant au moins deux heures et au maximum 24 heures à température ambiante par agitation sur un plateau balançant.

Une centrifugation à 1200 rpm (262g) pendant 1 minute permet de rassembler les complexes oligos-dT-ARNms dans le fond du tube. Ce culot est rincé une fois avec du tampon riche en sels et puis resuspendu dans 10ml de ce même tampon.

Cette solution est passée dans une colonne de chromatographie contenant un filtre en silice (poly-prep chromatography column, Bio-Rad) qui retient les complexes oligos-dT-ARNms. Deux rinçages de la colonne avec du tampon riche en sels sont effectués suivis ensuite par deux autres rinçages avec du tampon à faible concentration en sels. Ce dernier sert à détacher les molécules non spécifiques étant éventuellement attachées aux oligos-dT.

C'est grâce à un tampon ne contenant plus de sels et ayant une température de 55°C que les ARNm sont récupérés. La température élevée et la faible salinité déshybrident les poly-A des oligos-dT.

Une fois l'élution des ARNm terminée, la concentration en sels est ajustée grâce à l'ajout de NaCl 5M et 2 volumes d'éthanol froid à 95%. Le tout reste en standby au minimum une nuit à -20°C. Dans ces conditions, les ARNm précipitent.

### 3.3 Concentration des ARNm

Les échantillons sont concentrés grâce à des centrifugations successives de 15 minutes à 12000 rpm (1340g). Une fois celles-ci terminées, le culot est séché afin d'éliminer tout l'alcool. Les culots secs sont mis sur glace pendant 30 minutes et sont ensuite resuspendus dans 25 µl de tampon TE.

La concentration des échantillons en ARNm est déterminée par l'absorbance à 260nm. Toute contamination protéique est révélée par le ratio des longueurs d'ondes 280 nm et 260 nm. Idéalement, le ratio se situe entre 1,9 et 2,1.

Une fois concentré les ARNm sont conservés à -80°C.

## 4. Northern Blot

### Matériel utilisé :

#### MOPS 10x

- 3-(Nmorpholino)-propane sulfonic acide (MOPS) 0,2M
- Acétate de sodium 50mM
- EDTA (éthylènediaminetétraacétyl) 10mM

#### Solution tampon

- MOPS 0.2 M
- acétate de sodium trihydraté
- EDTA 10mM

#### Formamide désionisé

- Désionisation par incubation de 1g de « Mixed Bed Resin (AG-501-X8 (D), Bio-Rad) » avec 100ml de Formamide (MERCK) pendant 3-4heures suivi d'une filtration.

#### Tampon d'électrophorèse

- MOPS
- Formaldéhyde 3,3%
- H<sub>2</sub>O

#### Gel d'électrophorèse

- Agarose pure à 1,2% (Gibco-BRL) dans de l'H<sub>2</sub>O DEPC traitée
- MOPS
- Formaldéhyde 6,5%

#### 20x SSC

- NaCl 2,9M
- Citrate de Sodium 0,29M

#### RNA ladder 0.24 – 9.5Kb (Gibco-BRL)

#### Tampon de chargement

- Glycérol 50%
- Na<sub>2</sub>EDTA (éthylènediaminetétraacétyldisodium) 1mM
- Xylène Cyanol 0,4%
- Bleu de bromophénol 0,4%

### Méthode

Le volume d'échantillon à prélever pour avoir la même quantité d'ARNms dans chaque puits est calculé à partir de la valeur densitométrique. La quantité d'ARNms habituellement chargée par puits est de 1,5µg.

Les échantillons sont déshydratés au speedvac (Speedvac sc 100, Savant). Quand les échantillons sont secs, le culot est resuspendu dans un tampon contenant de la formamide et du formaldéhyde. Ces deux produits sont utilisés pour désapparier les structures secondaires formées par les ARNs.

Les ARNs resuspendus dans le tampon sont incubés durant 35 minutes à 65°C, température permettant elle aussi de désapparier les structures secondaires que forment les ARNs.

Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 4°C 12000rpm (1340 g) et directement placés sur glace afin d'éviter leur appariement à température ambiante.

Du tampon de chargement est ensuite ajouté aux échantillons.

Un marqueur de poids moléculaires contenant du RNA ladder, du bromure d'éthidium, du tampon de chargement et du tampon est aussi préparé. Le gel d'électrophorèse est polymérisé pendant 10 minutes à 75 volts avant d'y charger les échantillons. Après ces 10 minutes, le gel est chargé et la migration de 3 heures à 75 volts est lancée.

Quand la migration est terminée, une photo du gel sous rayonnement UV est réalisée ainsi que trois lavages dans de l'eau afin d'éliminer un maximum de formaldéhyde.

## Matériel et méthodes

Les ARNm ayant migrés en fonction de leur poids moléculaires sont transférés sur une membrane de nylon par le système Turboblotter (Schleicher et Schuell). Le transfert se fait par capillarité dans du tampon 20X SSC pendant une nuit.

Le lendemain, les ARNm transférés sur la membrane de nylon sont fixés de manière covalente par des rayons UVs (150mJ/cm<sup>2</sup>).

### 5. Hybridation NB avec sondes d'ADN complémentaires (ADNc) marquées au <sup>32</sup>P

#### Matériel utilisé :

<u>Solution d'hybridation</u>	<u>2x SSC/ 0,1% SDS</u>
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,12M	- H <sub>2</sub> O
- NaCl 0,25M	- 20xSSC
- SDS (sodium dodecyl sulfate)7%	- 0,1% SDS 10%
- Formamide désionisé 50%	
- pH 7,2	<u>0,5 xSSC 0,1% SDS</u>
	- H <sub>2</sub> O
<u>20x SSC</u>	- 20xSSC
- NaCl 2,9M	- 0,1% SDS 10%
- Citrate de Sodium 0,29M	
	<u>0,1 xSSC 0,1% SDS</u>
<u>Solution de stripping</u>	- 20xSSC
- 0,1 x SSC	- H <sub>2</sub> O
- SDS à 0,5%	- 0,1% SDS 10%
<u>2xSSC</u>	
- 20xSSC	
- H <sub>2</sub> O	

#### Méthode :

L'hybridation des sondes sur les ARNm se trouvant sur la membrane du Northern Blot se déroule dans des bouteilles à hybridation (Hybaid). Les membranes sont déposées sur un treillis de nylon et ensuite enroulées puis introduites dans la bouteille. Il faut veiller à ce que le montage soit bien étalé sur les parois de la bouteille. Ensuite, du tampon 2x SSC est ajouté pendant quelques minutes pour que les membranes soient bien mouillées. Celui-ci est remplacé par la solution d'hybridation, remplacée à son tour par de la solution d'hybridation fraîche et la membrane est incubée durant une heure. Le lavage a pour but de retirer de la membrane toutes traces de tampon 2x SSC et l'incubation d'une heure sert à masquer les sites non-spécifiques afin de diminuer le bruit de fond lors de la détection de la sonde.

Si la membrane a déjà été hybridée, il faut décrocher les sondes précédentes grâce à la solution de stripping.

Les ADNcs, repris dans le tableau 2-1, sont marqués par la méthode du « random priming » en utilisant 20ng d'ADNc obtenus purifiés après restriction.

L'ADNc est désapparié (5 minutes dans un bain-marie bouillant) et puis placé sur glace pour éviter tous réappariements. On lui ajoute ensuite des nucléotides non marqués dATP, dTTP et dGTP, mais aussi du fragment de Klenow de l'ADN-polymérase (kit Random Primers DNA, Invitrogen), les amorces aléatoires (random primer, kit Random Primers DNA, Invitrogen) et enfin les nucléotides marqués au <sup>32</sup>P dCTP (Amersham).



## Matériel et méthodes

Les amorces aléatoires s'hybrident à différents endroits de la sonde et servent de point de départ pour la polymérase. Après 1 heure 30 minutes, la réaction de polymérisation est arrêtée par le stop buffer (kit Random Primers DNA, Invitrogen).

Les nucléotides en excès vont être éliminés en passant sur une colonne de chromatographie Bio-Spin 30 (Bio-Rad). Dans cette colonne, les fragments de taille inférieure à 200 paires de bases sont également éliminés. La sonde est alors bouillie une nouvelle fois afin d'être certain qu'elle se trouve sous forme de monobrins et est ajoutée à 10 ml de solution d'hybridation. Ce mélange est alors mis en présence des membranes durant toute une nuit. La radioactivité de la sonde préparée est mesurée grâce au compteur à scintillation BECKMANN LS 6000. Une détection  $10^5$  et  $5 \times 10^5$  cpm signale une bonne incorporation d'activité radioactive.

Le lendemain, les membranes sont lavées dans différents bains afin de décrocher les sondes accrochées de manière non spécifique à la membrane. Les membranes subissent 3 lavages de 15 minutes dans une solution 2x SSC/0.1% SDS, 2 lavages de 15 minutes 0.5x SSC 0.1% SDS à 43°C et 2 lavages de 15 minutes 0.5x SSC 0.1% SDS à 65°C. Afin d'augmenter la spécificité d'hybridation et une meilleure détection des différents messagers de kératines qui ont des séquences nucléotidiques très proches les unes des autres, 3 lavages supplémentaires sont effectués avec de 0.1x SSC 0.1% SDS.

Une fois les lavages terminés, les membranes sont emballées dans du cellophane et placées sur un écran de phosphore (Storage Phosphore Screen, Packard). La durée d'exposition dépend de l'intensité du signal radioactif. L'analyse de l'image se fait par le programme Optiquant (Cyclone Storage Phosphor Screen, Packard). Les spots détectés témoignent de la présence de sondes radioactives. L'intensité des différents spots est proportionnelle à l'incorporation des nucléotides dCTP ( $\alpha$ - $^{32}$ P). A partir du programme Optiquant, il est possible de quantifier, via l'intensité du signal, l'expression des messagers en normalisant les valeurs de DLU (Digital Light Unit) de l'ARN d'intérêt par rapport à l'ARNm du gène de 36B4. Le gène de 36B4 est exprimé de manière constitutive dans les kératinocytes. Si les spots correspondant au 36B4 sont de même intensité, on peut en déduire que la même quantité d'ARNms a été chargée dans les différents puits et que le transfert sur membrane de nylon s'est effectué de manière homogène.

## 6. Extraction de protéines

### Matériel :

#### Tampon de lyse :

- Tris HCl (tris hydroxyméthylaminométhane hydrochloride) 62,5mM
- SDS 2%
- Glycérol 8,7%
- Bleu de bromophénol 0,05%
- DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma)

### Méthode :

Les boîtes de kératinocytes sont placées sur glace et le milieu de culture est enlevé. Les cellules sont lysées dans 200µl de tampon de lyse 2x concentré. Ce tampon de lyse contient du SDS qui détruit la membrane plasmique et donne un lysat cellulaire visqueux. Avant de doser les protéines, le lysat est bouilli durant 5 minutes afin de les dénaturer.

## 7. Western Blot

### Matériel :

#### Gel de séparation : (running gel)

- Tris base (tris hydroxyméthylaminométhane) 375mM à pH 8,8
- SDS 0,1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 10%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED ( N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine) 0,1%

#### Gel de tassement: (stacking gel)

- Tris base 125mM à pH 6,8
- SDS 0,1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 4%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED ( N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine) 0,1%

#### Tampon d'électrophorèse:

- Tris base 25mM
- Glycine 192mM
- SDS 0,1%

#### Tampon de transfert :

- Tris base 25mM
- Glycine 192mM
- Méthanol 20%

#### Tampon PBS :

- NaCl 136.86mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 8,09mM
- KCl 2,68mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47mM

#### Solution de rinçage:

- PBS 1x concentré
- Tween-20 0,1%

#### Solution de saturation :

- PBS 1x concentré
- Tween 20 0,1%
- Lait lyophilisé pauvre en matières grasses Gloria (Nestlé) à 5%

### Méthode :

Les protéines sont bouillies avant d'être déposées sur gel afin de les dénaturer. La quantité de protéines déposées dans chaque puits est de 100µg. Le gel électrophorétique est un gel de polyacrylamide 15% contenant 0.1% de SDS. Le SDS est un agent dénaturant se fixant sur les protéines et la répulsion des charges négatives du SDS provoque un dépliement de celles-ci. Dans le gel, les protéines migrent en fonction de leur taille qui est proportionnelle au poids moléculaire. Du glycérol pour alourdir l'échantillon et du bleu de bromophénol pour suivre le front de migration des petites protéines sont ajoutés. La séparation électrophorétique se fait à 150 Volts pendant 1h15minutes.

Les protéines séparées en fonction de leur taille sont transférées grâce à un processus électrophorétique sur une membrane PVDF contenant des pores de 0.45µm (Amersham). Ce transfert s'effectue durant la nuit à 150 volts.

Le lendemain, les membranes sont rincées avec du tampon de rinçage pour éliminer toutes les traces de méthanol provenant du tampon de transfert. Une incubation d'une heure dans de la solution de saturation constituée entre autre de 5% de lait écrémé (Gloria, Nestlé) qui permet de saturer la membrane afin d'éviter une fixation aspécifique de l'anticorps primaire. En effet, les molécules de lait se fixent sur la membrane sauf aux endroits où se trouvent les protéines transférées et n'empêchent pas les interactions spécifiques entre antigènes et anticorps.

La membrane est ensuite incubée dans l'anticorps primaire dilué dans cette même solution de saturation. Le temps de cette incubation est variable selon l'anticorps utilisé (tableau 2-2). Par exemple pour l'anticorps anti-p16, ce temps est de 1h, par contre pour les anticorps

## Matériel et méthodes

reconnaissant p38 et p38 phosphorylé, le temps d'incubation est de 2h. La dilution de l'anticorps est elle aussi spécifique de l'anticorps. Cette étape est suivie de trois rinçages de la membrane afin d'enlever tous les anticorps ne s'étant pas accrochés aux antigènes.

L'anticorps secondaire est alors mis en présence de la membrane. Il est lui aussi dilué dans la solution de saturation, est spécifique de la fraction constante de l'anticorps primaire et est couplé à l'enzyme « horse radish peroxidase » (HRP). Cette enzyme permet de détecter facilement la présence de l'anticorps et donc de la même manière la présence de l'antigène grâce au kit de révélation (Kit ECL, Amersham). La solution de révélation produit une réaction de chémoluminescence sur la membrane si la peroxydase est présente.

Le contrôle de charge est l'actine.

Dans les expériences effectuées ici, il n'est pas nécessaire de stripper la membrane avant de venir avec l'anticorps anti-actine car p16 a un petit poids moléculaire et l'actine a un poids moléculaire plus élevé et il n'y a pas de risque de chevauchement. Dans le cas de la détection des protéines phosphorylées, le contrôle de charge s'effectue en détectant la protéine dans sa forme totale pour autant qu'elle soit constante dans l'expérience. Comme le stripping de la membrane ne fonctionne pas de manière optimale et que les deux formes des protéines sont très proches l'une de l'autre, lors de chaque expériences, deux gels sont réalisés, un pour la forme totale et un pour la forme phosphorylée. La quantité de protéines chargée dans les deux gels est identique et toutes les étapes de migration, de transfert et d'incubation se déroulent en parallèle.

## 8. Fractionnement des cellules : séparation des noyaux de la fraction cytoplasmique

### Matériel :

#### PBS/ABC :

- KCl 2mM
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4mM
- NaCl 0.13M
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8mM
- pH 7.2
- $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.1mM

#### Saccharose 0.25M

### Méthode:

Le milieu de culture est retiré de la boîte et les cellules sont rincées deux fois avec de la solution PBS/ABC et une fois avec la solution de saccharose. Les cellules sont ensuite grattées dans 500µl de solution de saccharose, récoltées dans un tube et passées une trentaine de fois dans une aiguille 21G0 (21GX1<sup>1/2</sup>, diamètre 0.80X40mm, Braun) afin de détacher les cellules les unes des autres et de faire éclater les membranes plasmiques. Les cellules à sous-confluence sont passées en plus 5 à 10 fois dans un Potter, les cellules à confluence 20 à 30 fois et les cellules à post confluence plus d'une cinquantaine de fois. Les cellules à post-confluence sont difficilement séparables les unes des autres. Quand les cellules sont bien éclatées, on le vérifie au microscope optique, le lysat est centrifugé durant 10 minutes à 1700 rpm (517g) (IEC internationale centrifugeuse, refrigerated, international equipment company,

## Matériel et méthodes

Boston). Le surnageant est récupéré et contient la fraction cytoplasmique. Dans le but de purifier la fraction nucléaire qui contient en plus des noyaux les cellules qui éventuellement n'ont pas été éclatées ainsi que des lysosomes, la fraction nucléaire est resuspendue dans un volume de plus ou moins 5 ml de solution de saccharose et une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 1700 rpm (517g) est mise en place. Le surnageant est cette fois éliminé, considérant que la majeure partie du cytoplasme est retrouvée dans le premier surnageant, et le culot est resuspendu dans un petit volume de saccharose.

Un dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase est effectué dans la fraction nucléaire ainsi que dans la fraction cytoplasmique afin d'estimer la contamination lysosomale de la fraction nucléaire.

Un dosage des protéines est ensuite effectué afin de pouvoir charger la même quantité dans chaque puits du gel du Western Blot.

## 9. Marquage et immunofluorescence

### Matériel :

#### Tampon PBS/ABC :

- $\text{CaCl}_2$  0.9 mM
- KCl 2 mM
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM
- $\text{MgCl}_2$  0.5 mM
- NaCl 0.13 M
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  8 mM
- pH 7.2
- $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0.1mM

#### Solution de Topro

- Topro-3 dilué 80X
- RNase 2mg/ml
- PBS

#### Tampon PBS/BSA :

- Tampon PBS/ABC
- BSA (Bovine Albumine Serum) (sigma) à 0.1%
- Triton X-100 (Merck) à 0.02%

#### Tampon glycine :

- Tampon PBS/ABC
- Glycine 0.1 M

### Méthode :

Le protocole de culture des kératinocytes suit les indications données précédemment, si ce n'est qu'au lieu d'être ensemencés dans des boîtes de cultures, les kératinocytes sont ensemencés sur des lamelles en verre couvre-objet dans des plaques de 12 puits. Le marquage de p16 se fait grâce à un kit : p16<sup>INK4a</sup> Research Kit (Dakocytomation).

Le milieu de culture est retiré des boîtes et les cellules sont rincées avec du tampon PBS/ABC contenant de l'orthovanadate de sodium ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Sigma), qui est un inhibiteur des phosphatases. Les cellules sont placées durant 15 minutes dans du formaldéhyde à 4% préparé dans du PBS/ABC à partir d'une solution stock à 37°C (Merck) pour être fixées.

Cette étape est suivie de trois rinçages dans du PBS contenant de la glycine pour neutraliser les aldéhydes libres provenant du paraformaldéhyde.

Pour que l'anticorps primaire puisse se fixer sur les protéines cytoplasmiques et nucléaires, il est nécessaire de perméabiliser la cellule sinon celui-ci ne pourra pas entrer dans la cellule. Cette perméabilisation se fait grâce à du tritonX-100 qui est un détergent neutre. Le triton X-100 (Merck) et la BSA 0,1% (Sigma) ajoutés au PBS/ABC forment la solution de perméabilisation et permet également de saturer les sites non-spécifiques. Les cellules sont laissées 30 minutes dans cette solution.

## Matériel et méthodes

Les kératinocytes, fixés et saturés, se trouvant sur les lamelles sont alors prêts pour recevoir l'anticorps primaire. La dilution de l'anticorps se fait dans la solution de saturation. Pour une détection de p16 le temps d'incubation est de 1h (tableau 2-3).

Cette incubation est suivie de rinçages de 5 minutes dans du PBS/BSA.

Puis, suit une incubation d'une heure dans l'anticorps secondaire couplé à la sonde fluorescente *Alexa 488* (Molecular probes). Trois nouveaux rinçages dans la solution de saturation sont effectués. Suivis d'une dernière incubation dans du topro-3, le topro est un agent intercalant qui va se lier à l'ADN mais qui se lie également à l'ARN. Il faut donc détruire les ARN, c'est pour cette raison que le topro est dilué dans de l'ARNase. Après trois rinçage dans du PBS/BSA, le couvre objet est monté sur une lame porte-objet avec du Mowiol (Sigma) préchauffé à 57°C. L'observation du marquage et la prise de photos se fait au microscope confocal (Leica).

# Résultats

# 1. Etude de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques humains cultivés en milieu autocrine

## **1.1 Modèle de culture de kératinocytes épidermiques humains en culture autocrine**

### 1.1.1 Analyse morphologique des kératinocytes en microscopie en contraste de phase

Le modèle de culture utilisé au laboratoire prévoit que les cellules soient ensemencées à une densité variant entre 6000 et 10000 cellules par cm<sup>2</sup> dans du milieu KGM-2 complet c'est-à-dire qui contient tous les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération cellulaire. Le lendemain de la mise en culture, le milieu KGM-2 est remplacé par du milieu Epilife + contenant également tous les facteurs de croissance. Une fois que les kératinocytes recouvrent plus ou moins 50% de la surface de la boîte de culture, le milieu Epilife + est changé pour un milieu Epilife- ne contenant plus les facteurs de croissance, les cellules étant devenues capables de produire leurs propres facteurs de croissance. Les cultures atteignent successivement les trois stades étudiés c'est-à-dire la sous-confluence, la confluence et la post-confluence (Figure 3-1).

La sous-confluence est un stade de prolifération intensive des cellules caractérisé par un grand nombre de mitoses. Les cellules atteignant ce stade occupent plus ou moins 80% de la surface de la boîte de culture. Le temps moyen pour que des kératinocytes y arrivent est de 4 à 5 jours mais cela dépend de la souche utilisée. La morphologie des kératinocytes est allongée, il y a beaucoup d'espace entre les cellules et les jonctions cellulaires sont très réfringentes (Figure 3-1A et 3-1B).

La confluence est définie par un tapis cellulaire recouvrant la totalité de la surface de la boîte de culture et où le nombre de mitoses est théoriquement nul. Il s'agit d'un stade où l'on assiste à la transition d'une phase intensément proliférative vers une phase de différenciation progressive des kératinocytes. Les cellules ont perdu leur morphologie allongée et ont adopté une forme polyédrique. Il n'y a plus d'espace visible entre les cellules et les jonctions cellulaires ont perdu leur réfringence. La détermination précise de ce stade peut poser quelques problèmes car cultivées en milieu Epilife, les cellules forment un tapis cellulaire mais qui présente encore une discrète activité mitotique (Figure 3-1C et 3-1D).

La post-confluence est une phase de stratification. Ce stade est généralement atteint 4 jours après le stade de confluence. Certaines cellules formant le tapis cellulaire se détachent de la boîte de culture pour former une deuxième assise de cellules. On observe des îlots de différenciation. Une autre des caractéristique de ce stade de culture est la présence fréquente de granulation dans le cytoplasme (Figure 3-1E et 3-1F).

### 1.1.2 Analyse de l'expression des marqueurs de différenciation épidermique

Afin de caractériser le modèle de culture utilisé au laboratoire, l'expression de différents marqueurs de différenciation est étudiée aux différents stades de culture.

## Résultats

*In vivo*, la stratification de l'épiderme témoigne de la différenciation progressive et est accompagnée de l'expression de différentes protéines qui sont des marqueurs spécifiques de certaines couches. Ces protéines sont entre autres les kératines 1 et 10, l'involucrine, la loricrine, la filaggrine.

Dans le but de suivre la différenciation des kératinocytes aux différents stades, la présence de ces marqueurs est mise en évidence et ce aussi bien d'un point de vue protéine que d'un point de vue des ARN messagers.

L'analyse des ARN messagers est réalisée par la technique du Northern Blot. Pour vérifier l'homogénéité du chargement, l'expression d'un « housekeeping gene » est testée. 36B4 est exprimé de manière constitutive dans les kératinocytes et il code pour la phosphoprotéine ribosomique humaine PO (Laborda, 1991).

L'expression de la kératine 14 (K14) est élevée et constante à sous-confluence, confluence et post-confluence (Figure 3-2).

La kératine 10 (K10) apparaît à confluence K10 et augmenter à post-confluence (Figure 3-2).

L'involucrine est observée à confluence pour augmenter à post-confluence (Figure 3-2).

L'analyse des protéines par la technique du Western Blot montre le même profil d'expression pour la kératine 10 et pour l'involucrine. K14 n'est pas testée en protéine. Le contrôle de charge est l'actine (Figure 3-3).

A partir de ces observations, plusieurs assimilations théoriques entre le modèle de culture et la peau ont pu être faites. A sous-confluence, les kératinocytes expriment très fortement la kératine K14 et très peu les autres marqueurs de différenciation, on peut donc assimiler de manière théorique la sous-confluence à la couche basale de l'épiderme *in vivo*. A confluence, l'expression de K10, un marqueur n'apparaissant qu'à partir de la couche épineuse, commence à augmenter alors que les kératinocytes ne prolifèrent plus. A post-confluence, l'expression de l'involucrine est fortement induite. L'évolution de K10 et de l'involucrine marquent la différenciation observée *in vivo*.

Le fait que K14 soit encore présente à post-confluence suggère que, dans le modèle de culture utilisé au laboratoire, des cellules de la couche basales sont encore présentes aux stades avancés de culture.

### **1.2 Expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques en culture autocrine.**

#### **1.2.1 Expression des ARN messagers de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques en culture autocrine.**

Le premier volet de mon travail a été de caractériser l'expression des ARN messagers de p16<sup>INK4a</sup> dans la souche de kératinocytes épidermiques, NAK135. Les ARN messagers sont extraits des cellules en culture à sous-confluence, confluence et post-confluence.

La Figure 3-4 montre que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> diminue de la sous-confluence à la post-confluence. Ces résultats ont été répétés trois fois dans la souche de kératinocytes NAK135 et ont été étendu aux souches de kératinocytes NAK138 et NAK133. Comme nous le montre la Figure 3-4A, il y a une diminution d'expression de p16<sup>INK4a</sup> avec la différenciation dans les trois souches cellulaires. Donc dans trois lignées dont certaines ont été testées plusieurs fois on retrouve le même profil d'expression de p16<sup>INK4a</sup>.

Les cellules hTERT servent de témoins négatifs pour p16<sup>INK4a</sup>. En effet, dans ces cellules la télomérase est surexprimée et le gène de p16<sup>INK4a</sup> est délété. Les cellules E6E7 servent de



## Résultats

témoins positifs pour p16. Les cellules E6E7 surexpriment le gène de p16<sup>INK4a</sup> (cellules transfectées avec un plasmide contenant la protéine E7 de HPV16).

L'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules E6E7 est présente à tous les stades de culture tandis que dans les cellules hTERT aucune expression n'est détectée (Figure 3-4A).

La figure 3-4A nous montre également l'évolution des marqueurs de différenciation K10 et involucrine dans les différentes souches. Ces marqueurs permettent de confirmer à quel stade se trouvent les cellules. Néanmoins aussi bien dans les cellules hTERT que dans les cellules E6E7 l'expression de l'involucrine est faible et tardive.

La figure 3-4B nous montre l'analyse « quantitative » des variations d'expression de p16<sup>INK4a</sup> au sein des souches de kératinocytes NAK135, NAK138 et NAK133. Cela est réalisé grâce au programme Optiquant (Cyclone Storage Phosphor Screen, Packard) qui analyse l'intensité des spots détectés. Cette intensité étant proportionnelle à l'incorporation des nucléotides dCTP marqués au <sup>32</sup>P, il est possible de quantifier l'expression des ARNmessagers, via cette intensité, en normalisant les valeurs de DLU (Digital Light Unit) du gène d'intérêt par rapport à 36B4.

La figure 3-4B confirme que dans toutes les souches de kératinocytes, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> diminue de la sous-confluence à la post-confluence. Dans les cellules témoins positifs E6E7, on constate qu'il y a une légère augmentation de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence suivie ensuite d'une diminution plus marquée à post-confluence.

## Résultats

### 1.2.2 Expression protéique de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine

Suite à l'analyse des ARN messagers, nous nous sommes intéressés à l'expression de p16<sup>INK4a</sup> d'un point de vue protéique.

La figure 3-5 montre l'expression de p16<sup>INK4a</sup> en fonction de la différenciation dans les souches de kératinocytes NAK135, NAK138, NAK133 et NAK129, ainsi que dans les cellules témoins négatifs et positifs pour p16.

Dans trois souches de kératinocytes épidermiques étudiées, NAK135, NAK138 et NAK129, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> diminue de la sous-confluence à la confluence et de la confluence à la post-confluence. Pour NAK133, si l'expression de p16<sup>INK4a</sup> diminue globalement de la sous-confluence à la post-confluence, elle augmente de la sous-confluence à la confluence. Ces résultats ont été confirmés six fois pour la souche de kératinocytes NAK135, quatre fois pour NAK138, trois fois pour NAK129 et deux fois pour NAK133.

Un parallélisme avec les ARNmessagers peut donc être fait.

Dans la figure 3-5, on peut également observer l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules témoins hTERT et E6E7. Dans les cellules E6E7, il y a une augmentation d'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence suivie d'une diminution à post-confluence. Aucune expression n'est détectée dans les cellules hTERT.

Les marqueurs de différenciation K10 et involucrine sont détectés pour montrer à quel stade se trouvent les cellules.

## 2. Etude de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les fractions nucléaire et cytoplasmique de kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine

### 2.1 Préliminaires

L'étude de l'expression nucléaire et cytoplasmique de p16<sup>INK4a</sup> résulte d'une constatation faite lors de l'approche immunohistochimique de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes *in vitro* et dans des biopsies de lésions cervicales. (Figure 3-6 et 3-7).

La protéine est détectée grâce au chromogène DAB provenant du kit de Dakocytomation (Liquid DAB + substrate-chromogène solution). Lors de la révélation, les peroxydases catalysent, via l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'oxydation d'amines aromatiques comme la diaminobenzidine (DAB) en composés colorés.

Les résultats obtenus au laboratoire montrent que dans les biopsies de cols utérins atteints de dysplasies de haut degré, il y a surexpression essentiellement cytoplasmique de la protéine p16<sup>INK4a</sup> (Figure 3-6). Par contre dans des certaines biopsies ne montrant que des dysplasies de faible degré, il n'y a pas de surexpression de p16<sup>INK4a</sup>.

Dans les kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine, on s'attendait à observer une localisation quasi exclusivement nucléaire de p16<sup>INK4a</sup>. Or lorsque la protéine est détectée dans les kératinocytes épidermiques, on constate qu'il y a une expression cytoplasmique à renforcement périnucléaire de p16<sup>INK4a</sup> (Figure 3-7). L'expression nucléaire de la protéine est très faible tandis que la cytoplasmique est importante.

Suite à ces observations, et toujours dans un but de caractérisation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques en autocrinie, nous avons choisi la technique de microscopie confocale et une technique de centrifugation. On va suivre l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques au cours de la différenciation cellulaire.

## **2.2 Etude immunohistochimique, en microscopie confocale, de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine**

Avant toute chose, il est important de rappeler que l'approche immunohistochimique ne permet pas une réelle étude quantitative.

La figure 3-8 nous montre l'évolution de l'expression, aussi bien nucléaire que cytoplasmique, de p16<sup>INK4a</sup> dans la souche de kératinocytes épidermique NAK135.

Tout d'abord, au point de vue des noyaux, on constate qu'à sous-confluence les noyaux sont intensément marqués et avec la différenciation cellulaire, ce marquage est diminué à confluence pour enfin disparaître à post-confluence. On assiste donc à une diminution d'expression de la sous-confluence à la post-confluence dans les noyaux, ce qui rappelle le correspond au profil observé en Western Blot.

Dans la fraction cytoplasmique, le marquage est très intense à sous-confluence, et diminue un peu d'intensité à confluence et à post-confluence.

Bien que l'immunohistochimie ne soit pas une étude quantitative, en observant les petits grossissements de la souche NAK135, on se rend compte qu'il y a moins de cellules positives pour p16<sup>INK4a</sup> à sous-confluence, que leur nombre paraît plus important à confluence et semble diminuer avec la post-confluence.

## Résultats

Si on se remémore les résultats obtenus en Western Blot, on se rappelle que sur les quatre souches de kératinocytes épidermiques étudiées, une donnait un profil d'expression de p16<sup>INK4a</sup> un peu différent des autres. En effet, la souche NAK133 montre une augmentation d'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence qui ensuite diminue à post-confluence.

La figure 3-9 montre la comparaison immunohistochimique de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes de la souche NAK133 et ceux de la souche NAK138.

Les cellules de la souche de NAK138 montrent un profil d'expression de p16<sup>INK4a</sup> semblable à celui observé dans les cellules de la souche NAK135 au niveau des Western Blot, à savoir une diminution d'expression de la sous-confluence à la post-confluence. En immunohistochimie, on observe aussi la même chose. Au point de vue nucléaire, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> diminue avec la différenciation pour aller jusqu'à disparaître à post-confluence. Au niveau du cytoplasme, on observe également un marquage plus intense à sous-confluence qu'à confluence et à post-confluence.

Pour la souche de kératinocytes NAK133, au niveau du noyau, on observe une expression intense de p16<sup>INK4a</sup> à sous-confluence. À confluence, l'expression nucléaire est encore très forte en comparaison avec l'expression observée dans les deux autres souches et à post-confluence elle diminue. Au niveau cytoplasmique, le profil est le même que pour les deux autres souches, c'est-à-dire un marquage important à sous-confluence qui diminue avec la différenciation.

L'expression nucléaire de p16<sup>INK4a</sup> suit donc, lors de la différenciation de NAK135, NAK138 et NAK133, les caractéristiques observées au Western Blot.

### **2.3 Etude de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les fractions nucléaire et cytoplasmique de kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine séparés par centrifugation**

Suite aux observations des résultats obtenus par immunohistochimie, nous avons décidé de caractériser par Western Blot, non plus l'expression globale de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes mais plutôt caractériser l'expression de cette protéine dans les deux fractions différentes : le noyau et le cytoplasme.

Une technique de séparation du noyau du reste de la cellule a été envisagée pour essayer de caractériser ces deux fractions. Les cellules sont lysées mécaniquement, le lysat est ensuite centrifugé. Les noyaux forment un culot dans le fond du tube et le surnageant représente la fraction cytoplasmique. Cette expérience de fractionnement est menée en parallèle dans les quatre souches de kératinocytes épidermiques NAK135, NAK138, NAK129 et NAK133.

La figure 3-10 nous montre les différents résultats obtenus dans les différentes souches après le fractionnement.

Dans la fraction cytoplasmique des souches de kératinocytes NAK135, NAK133 et NAK129, le profil d'expression de p16<sup>INK4a</sup> observé concorde avec celui observé lors de la caractérisation de l'expression globale. Une diminution de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la post-confluence pour NAK135 et NAK129, et une augmentation de la sous-confluence à la confluence suivie d'une diminution à post-confluence pour NAK133.

Pour la souche NAK138, il semble qu'il y ait une augmentation d'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence suivie ensuite d'une diminution quand les cellules deviennent post-confluentes. Néanmoins, le contrôle de charge, l'actine, n'est pas homogène, il semble que plus de matériel a été chargé au niveau de la confluence. Peut-être que cette différence de chargement explique l'augmentation de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence.

D'une manière générale, on peut dire que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la fraction cytoplasmique varie de la même manière que l'expression observée dans la cellule totale.

La fraction cytoplasmique est considéré comme pure et ne contenant pas de noyau. Même si quelques noyaux persistaient dans cette fraction, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> qu'ils apporteraient ne serait pas assez forte que pour modifier les résultats observés.

Les résultats obtenus pour la fraction nucléaire ne permettent pas d'interprétation.

Il semble en effet que la fraction nucléaire ne soit pas pure, ce qui est suggéré par la présence d'actine. De plus, sur chacune de ces fractions nucléaires une détection de l'activité  $\beta$ -galactosidase a été effectuée. Le pourcentage de cette activité variait entre 20 et 30%. La détection d'autant d'activité  $\beta$ -galactosidase prouve également que cette fraction dite nucléaire n'est pas pure et contient en plus des noyaux, au moins des lysosomes. Aucune conclusion n'est tirée à partir de ces résultats.

Pour étudier de manière plus appropriée ce qui se passe dans les noyaux, il faudrait trouver une technique permettant d'obtenir une fraction nucléaire pure.

Cette approche, malgré ses imperfections, permet tout de même de confirmer l'analyse immunohistochimique quant à l'existence (non négligeable) d'une fraction cytoplasmique de p16<sup>INK4a</sup>.

### 3. Influence du milieu de culture sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques

L'article de Chaturvedi et al. publié en 2003 dans *l'American Journal of Pathology* : « Role of INK4a/Arf Locus-Encoded Senescent Checkpoints Activated in Normal and Psoriatic Keratinocytes » est en contradiction avec les résultats que nous avons observés dans la première partie de mon travail.

La figure 3-11 tirée de l'article montre que la protéine p16<sup>INK4a</sup> augmente de la sous-confluence à la post-confluence. Ce profil d'expression est exactement l'inverse du profil que l'on observe au laboratoire dans notre modèle.

Dans cet article, les auteurs ont montré qu'à confluence les kératinocytes sont caractérisés biochimiquement par la présence de la protéine du rétinoblastome sous forme hypophosphorylée, une diminution de E2F, et une augmentation de cyclines D1, de p27, de p21, de p16<sup>INK4a</sup> et de p14<sup>ARF</sup>. Ils ont remarqué que l'expression de Ras augmente une fois que les cellules deviennent confluentes en comparaison avec des cellules en pleine prolifération. Ils ont ensuite étudié la voie se trouvant en aval de Ras et ont trouvé que les formes phosphorylées de Raf et de ERK augmentent avec la confluence. Ils en viennent à suggérer que Ras/Raf/ERK pourrait être impliqués dans la surexpression de p16<sup>INK4a</sup> induite par la confluence. Ils ont aussi testé l'expression d'autres protéines.

Comme nous avons à notre disposition des anticorps anti-ERK phosphorylé et anti-ERK total, nous avons décidé de tester l'expression de ces protéines sur nos kératinocytes cultivés en milieu autocrine afin de voir si notre modèle différait du leur en d'autres points que p16<sup>INK4a</sup>.

La figure 3-12 nous montre que comme p16<sup>INK4a</sup>, la protéine ERK-phosphorylée diminue de la sous-confluence à la post-confluence dans les trois souches de kératinocytes épidermiques étudiées NAK135, NAK138 et NAK129. Dans la souche NAK129, on ne détecte pas d'ERK-Phosphorylé à sous-confluence, mais de la confluence à la post-confluence il y a une diminution. Cette absence d'expression est sans doute due à une erreur de manipulation.

L'expression de p16<sup>INK4a</sup> et de ERK-phosphorylé évoluent parallèlement mais en sens inverse de l'article.

Une différence majeure entre l'article de Chaturvedi et al. et les expériences que nous menons au laboratoire concerne le milieu de culture.

Dans l'article, les kératinocytes épidermiques sont cultivés en milieu KGM complet c'est-à-dire qui contient tous les facteurs de croissance (KGM+). Au laboratoire, nous mettons les cellules en culture dans du milieu KGM+, que l'on remplace le lendemain par du milieu Epilife contenant tous les facteurs de croissance (Epilife+) qui est lui aussi remplacé par du milieu Epilife ne contenant plus de facteurs de croissance (Epilife-) quand les cellules occupent plus ou moins 50% de la surface de la boîte de culture car elles sont alors capables de produire leur propre facteurs de croissance.

## Résultats

Afin de tester l'hypothèse du milieu de culture, nous avons décidé de cultiver la même souche de kératinocytes épidermiques, NAK135, dans quatre milieux de différents : KGM+ (milieu KGM contenant tous les facteurs de croissance); KGM- (milieu KGM ne contenant plus de facteurs de croissance) ; Epilife + (milieu Epilife contenant tous les facteurs de croissance) et Epilife – (milieu Epilife sans facteurs de croissance, notre modèle).

La figure 3-13 résume les résultats obtenus.

Quand les cellules sont cultivées en milieu Epilife + (figure 3-13A), l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas avec la différenciation. Les marqueurs de différenciations sont aussi détectés, l'involucrine augmente de la sous-confluence à la post-confluence tandis que la kératine 10 n'augmente pas et semble même diminuer de la sous-confluence à la confluence.

En milieu Epilife -, notre modèle, on observe une diminution de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la post-confluence, comme ce que l'on a toujours observé, et les marqueurs K10 et involucrine augmentent avec la différenciation.

Les protéines des kératinocytes cultivés en Epilife + et en Epilife – ont migré dans le même gel. Le temps d'exposition du film sur la membrane de Western Blot est le même. De ce fait, on peut dire que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est plus forte dans les cellules cultivées en milieu Epilife + que dans les cellules cultivées en milieu Epilife -.

En ce qui concerne les cellules cultivées en milieu KGM +, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas avec la différenciation (Figure 3-13B).

Dans les cellules cultivées en milieu KGM – (Figure 3-13B), l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne semble pas varier de la sous-confluence à la confluence.

Le temps d'exposition du film sur la membrane de Western Blot est le même que celui pour la membrane sur laquelle se trouve les échantillons cultivés en Epilife, on peut donc dire ici aussi que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est moins forte quand les cellules se trouvent en milieu KGM que dans les cellules cultivées en Epilife. Par ailleurs, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> en KGM- est moindre qu'en KGM+.

Dans les conditions testées, on peut dire que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas avec la différenciation sauf en milieu Epilife- où elle diminue.

Il aurait été intéressant de tester l'expression de ERK-Phosphorylé dans ces quatre milieux de culture.

Ces résultats n'ont pas encore été répétés par manque de temps.



## 4. Etude de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine et exposés à des rayons ultraviolets

### 4.1 Préliminaires

Dans les différentes parties de mon travail, nous nous sommes intéressé essentiellement à la régulation de p16<sup>INK4a</sup> avec la différenciation cellulaire.

D'après la littérature, il y aurait une régulation positive de p16<sup>INK4a</sup> par les UV.

### 4.2 Expression des ARNmessagers de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine et exposés aux UV

Une première expérience a été faite sur la souche de kératinocytes épidermiques NAK135 à sous-confluence.

Une erreur a été faite au début de cette étude. En effet, nous n'avons pas fait de courbe de doses, les doses auxquelles les kératinocytes épidermiques vont être soumis sont basées sur les données de la littérature.

NAK135, est exposée à des doses de rayons ultraviolets de 150 et 300mJ/cm<sup>2</sup>. Les ARNmessagers sont étudiés 6 heures, 12 heures et 24 heures après le traitement. Des cellules contrôles de la même souche sont cultivées en parallèle pour avoir un point de comparaison de l'expression. Ces cellules contrôles sont mises dans du PBS comme les cellules traitées aux UV mais ne sont pas exposées (Figure 3-14).

La figure 3-14A montre la membrane de Northern Blot. Que ce soit 6 heures, 12 heures ou 24 heures après le traitement, il ne semble pas y avoir de variation d'expression de p16<sup>INK4a</sup> suite à l'exposition aux rayons UV.

La figure 3-14B nous montre les résultats de l'analyse quantitative des ARNmessagers des kératinocytes épidermiques de NAK135 traités aux UV (DLU : Digital Light Unit).

On constate que dans les cellules traitées il y a une petite diminution de p16<sup>INK4a</sup> par rapport aux cellules contrôles. Néanmoins, cette diminution n'est pas très importante et est sans doute non-significative.

Une autre souche de kératinocytes épidermiques, NAK138 à sous-confluence, a été soumise à un traitement aux rayons UV à une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup>.

Les résultats de cette expérience (résultats non montré) ne sont pas différents de ceux obtenus pour la souche de NAK135. L'expression des ARNmessagers de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas avec le traitement aux UV à 500mJ/cm<sup>2</sup>.

La souche NAK135 à post-confluence a également été traitée avec une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup>. Aucune variation d'expression de p16<sup>INK4a</sup> n'a été également observée dans cette expérience (résultats non montré).

A ce moment, nous pensons que les traitements des cellules aux UV n'ont pas eu d'effets sur l'expression des ARNmessagers de p16<sup>INK4a</sup> soit parce que la dose reçue par les cellules n'est

## Résultats

pas assez importante pour influencer p16<sup>INK4a</sup> soit parce que nous ne traitons pas les cellules au « bon » moment ou soit parce que la régulation de p16<sup>INK4a</sup> par les UV ne se fait à un niveau post-transcriptionnel ce qui a été suggéré par Chazal et al., 2002.

### **4.3 Expression de la protéine p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine et exposés aux UV**

Par manque de temps, nous abandonnons les ARN pour nous tourner vers les protéines. Les kératinocytes seront dans un premier temps traités à haute dose d'UV et à tous les stades de différenciation.

#### **4.3.1 Expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques exposés à une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup> de rayons ultraviolets**

La souche de kératinocytes épidermiques NAK135 a été exposée à une dose de rayons ultraviolets de 500mJ/cm<sup>2</sup>, les protéines sont analysées 6 heures, 12 heures et 24 heures après le traitement.

L'expression de p16<sup>INK4a</sup> est étudiée à sous-confluence, confluence et post-confluence

Dans les kératinocytes à sous-confluence (Figure 3-15A), il y a une diminution de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules traitées aux UV par rapport aux cellules contrôles 6 heures, 12 heures et 24 heures après le traitement.

Dans les cellules contrôles, on observe également une diminution d'expression avec le temps (effet de différenciation ?). La protéine p53, marqueur classique d'exposition aux UV, ne varie pas dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles.

Dans les kératinocytes à confluence (Figure 3-15B), 12 heures et 24 heures après le traitement, il y a une diminution de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> mais de nouveau, l'expression de p53 ne varie pas. Par contre, 6 heures après le traitement, il semble que p16<sup>INK4a</sup> et p53 sont induits par les UV mais le niveau dans les contrôles est très bas.

A post-confluence (Figure 3-15C), il semble que 12 heures et 24 heures après le traitement il y a une induction de p16<sup>INK4a</sup> et de p53. 6 heures après le traitement, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> augmente alors que p53 diminue.

Une autre souche de kératinocytes épidermiques, NAK129, a été traitée aux UV à une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup> (résultats non montré).

A sous-confluence on observe également une diminution de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées, 6 heures, 12 heures et 24 heures après le traitement. p53 n'est pas induit dans les cellules traitées.

A confluence, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas et p53 non plus.

A post-confluence par contre, 6 heures, 12 heures et 24 heures après le traitement p16<sup>INK4a</sup> et p53 sont induites.

Il aurait été intéressant de détecter la kératine 10 ainsi que l'involucrine sur les cellules traitées pour voir si les UV ont un effet sur la différenciation pour les cellules à sous-confluence. Il semble sortir de ces expériences qu'à post-confluence l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est induite suite à un traitement aux UV en parallèle avec p53. Pour la sous-confluence et la confluence, peut-on vraiment tirer des conclusions sur ce que l'on observe vu qu'il n'y a pas

## Résultats

d'induction de p53 ? Est-ce que les UV ont vraiment eut un effet sur la cellule ? Ceci dit, une diminution répétée de p16<sup>INK4a</sup> à sous-confluence est observée.

### 4.3.2 Expression de p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes épidermiques exposés à plusieurs doses de rayons ultraviolets

Comme dans les deux souches de kératinocytes épidermiques, NAK135 et NAK129, à sous-confluence et à confluence la protéine p53 n'a pas été induite et que à post-confluence l'induction est faible, on s'est dit que la dose administrée aux cellules n'était pas assez importante. On a alors décidé de traiter les cellules de la souche NAK135 à sous-confluence trois fois sur la journée avec une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup> et un intervalle de deux heures entre chaque traitement.

Une diminution de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est observée 18 heures et 24 heures après le traitement mais 6 heures après le traitement l'expression ne semble pas varier.

L'expression de p53 est induite très clairement avec les traitements (résultats non montré).

Véronique Vallery qui travaille avec des cellules hTERT m'a suggéré d'utiliser son modèle pour essayer d'induire l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes.

Dans son modèle, elle traite ses cellules sur deux jours. 4 traitements de 300mJ/cm<sup>2</sup> toutes les deux heures, deux jours de suite. Pour cette expérience, les cellules de la souche NAK135 sont utilisées et ont été exposées aux UV à sous-confluence, confluence et post-confluence.

A sous-confluence (Figure 3-16A), l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas dans les cellules traitées aux UV sauf 24h après le traitement où p16<sup>INK4a</sup> diminue dans les cellules traitées. Par contre, la protéine p53 est induite très clairement par les UV.

Dans les cellules à confluence (Figure 3-16B), les résultats ne sont pas de toute première qualité, il s'avère que 6 heures après le traitement, p16<sup>INK4a</sup> diminue dans les cellules traitées, 18 heures après le traitement il ne semble pas varier et 24 heures après il augmente. p53 est induit avec le traitement sauf 24h après le traitement.

Il faut néanmoins remarquer que le stade de confluence est un stade assez délicat dans ce genre d'expériences car le traitement s'étale sur deux jours et que les protéines sont analysées 6 heures, 18 heures et 24 heures après le traitement et que donc le stade de confluence est dépassé.

Dans les cellules à post-confluence (Figure 3-16C), 6 heures, 18 heures et 24heures après le traitement, p16<sup>INK4a</sup> et p53 sont induits par les UV.

# Discussion et perspectives

## Discussion et perspectives

p16<sup>INK4a</sup> est un régulateur négatif du cycle cellulaire qui agit en inhibant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB) par le complexe CDK4/cycline D1. Quand elle n'est pas phosphorylée, cette protéine pRB est active et retient le facteur de transcription E2F ce qui empêche l'entrée en phase S du cycle.

Dans la peau normale, aucune expression de p16<sup>INK4a</sup> n'est décelée par immunohistochimie (Ahmed et al., 1999).

Certains cancers sont caractérisés par la perte d'expression de p16<sup>INK4a</sup>. Cette perte résulte de mutations somatiques ou constitutionnelles (comme dans les mélanomes familiaux ; Chin et al., 1998 ; Bennett et al., 2002) mais également de phénomènes épigénétiques tels que par exemple, la méthylation du promoteur. Par contre, d'autres tumeurs malignes, comme celles dérivant des kératinocytes (maladie de Bowen et carcinomes épidermoïdes) montrent souvent une surexpression de p16<sup>INK4a</sup> (Nilsson et al., 2004 ; Brown et al., 2004 ; Murao et al., 2005 ; Salama et al., 2003). Cette surexpression peut s'expliquer soit par des mutations inactivatrices s'accompagnant de la production d'une protéine détectable mais inefficace (tronquée par exemple), soit par une surexpression d'une protéine p16<sup>INK4a</sup> normale.

Dans les tumeurs du col de l'utérus liées aux papillomavirus humains oncogènes, les kératinocytes infectés montrent une forte expression de p16<sup>INK4a</sup> (Harald zur Hausen, 2002). L'oncoprotéine E7 est responsable de la libération du facteur de transcription E2F par la protéine pRB, ce qui entraîne une surexpression de p16<sup>INK4a</sup> incapable dans ce contexte de bloquer le cycle cellulaire.

Chaturvedi et al., 2003, ont montré par Western Blot que l'expression de la protéine p16<sup>INK4a</sup> dans des kératinocytes en culture varie avec la différenciation cellulaire. Ces auteurs ont observé une augmentation de son expression de la sous-confluence à la post-confluence.

Beaucoup reste à apprendre sur l'expression, la régulation et les fonctions de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes épidermiques normaux.

L'objectif de ce mémoire a été de caractériser la régulation de p16<sup>INK4a</sup> dans le modèle de différenciation épidermique en autocrinie utilisé au laboratoire (Poumay et al., 1995).

## **1. Les kératinocytes épidermiques normaux en culture autocrine expriment p16<sup>INK4a</sup>**

A ce stade, la littérature semble montrer que dans les kératinocytes épidermiques *in vivo*<sup>1</sup> aucune expression de p16<sup>INK4a</sup> n'est détectée par immunohistochimie.

Des marquages immunohistochimiques de peaux normales ont été effectués au laboratoire et dans la plupart des cas, aucune détection de p16<sup>INK4a</sup> n'est signalée (Figure 4-1A). Néanmoins, dans certaines peaux, un marquage de p16<sup>INK4a</sup> est occasionnellement décelé de manière focale dans la couche granuleuse de l'épiderme c'est-à-dire une couche où le kératinocyte est déjà bien différencié (Figure 4-1B).

En culture, les kératinocytes humains expriment p16<sup>INK4a</sup>. Ceci avait déjà été montré dans la littérature (Chaturvedi et al., 2003), mais a été confirmé ici en culture autocrine par immunohistochimie, par Western Blot et par Northern Blot.

Pourquoi observe-t-on une discordance avec ce qui se passe *in vivo* ?

1) La technique immunohistochimique utilisée pour détecter la présence de p16<sup>INK4a</sup> sur un épiderme n'est peut-être pas assez sensible. Une RQ-PCR permettrait peut-être de mettre en évidence la présence d'ARNm à partir d'épidermes prélevés sur le vivant.

2) Il faut bien se rendre compte également que la culture de kératinocyte est différente d'un épiderme. Les cellules en culture se rapprochent plus d'un modèle de migration et de cicatrisation épidermique.

Il serait dès lors intéressant de tester la présence de p16<sup>INK4a</sup> en immunohistochimie sur une peau en cicatrisation.

---

<sup>1</sup> Durant ce mémoire, les protéines d'un épiderme ont été récoltées et analysées par Western Blot. Aucune expression de p16<sup>INK4a</sup> n'a été observée (non montré).

## **2. L'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans notre modèle est régulée par la différenciation**

Dans nos conditions de culture autocrine, l'expression des ARNmessagers et des protéines de p16<sup>INK4a</sup> diminue avec la différenciation. Les lignées de kératinocytes montrent une diminution de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence et de la confluence à la post-confluence. Néanmoins, sur les quatre lignées testées, une lignée montre un profil légèrement différent au niveau des protéines, avec une augmentation d'expression de la sous-confluence à la confluence et une diminution de la confluence à la post-confluence, le bilan net étant tout de même une diminution d'expression de p16<sup>INK4a</sup> avec la différenciation (de la sous-confluence à la post-confluence).

### **2.1 Influence du milieu de culture sur l'expression de p16<sup>INK4a</sup>**

Dans les kératinocytes épidermiques cultivés dans du milieu Epilife-, notre milieu de référence, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> décroît avec la différenciation cellulaire.

Quand les cellules sont cultivées dans du milieu Epilife+, c'est-à-dire contenant divers facteurs de croissance, on observe une stabilisation et une majoration de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> qui reste par ailleurs constante à tous les stades de différenciation.

En milieu KGM+, contenant les facteurs de croissance, et KGM-, ne les contenant pas, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas avec la différenciation. L'expression de p16<sup>INK4a</sup> est moindre en milieu KGM qu'en milieu Epilife.

Chaturvedi et al., 2003 ont montré un profil d'expression protéique de p16<sup>INK4a</sup> opposé au nôtre à savoir, une augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> avec la différenciation. Ces auteurs travaillent dans un milieu KGM+ et observent une augmentation d'expression de p16<sup>INK4a</sup> de la sous-confluence à la confluence et de la confluence à la post-confluence. De plus, ils ont étudié le lien qu'il existait entre la protéine p16<sup>INK4a</sup> et la protéine ERK-phosphorylée qui montre également une diminution d'expression en fonction de la différenciation.

Nous avons montré que tout comme p16<sup>INK4a</sup>, ERK-phosphorylé évolue, dans notre modèle de différenciation, de manière tout à fait inverse à celle de l'article de Chaturvedi et al., 2003. Les expériences que nous avons réalisées dans les différents milieux de culture n'ont pas été répétées. Ces résultats sont donc des résultats préliminaires. Outre les protéines, il serait intéressant de caractériser l'expression des ARNmessagers de kératinocytes épidermiques cultivés dans différents milieux.

Pourquoi observe-t-on une différence d'expression de p16<sup>INK4a</sup> avec le milieu de culture ?

Bill et al., 2004 ont montré que la présence d'EGF (Epidermal Growth Factor) dans le milieu induit la transcription de gènes dépendants de E2F. La littérature nous a également appris que E2F induit la transcription de p16<sup>INK4a</sup> (Harald zur Hausen, 2002 ; Khleif et al., 1996)

Dans le milieu Epilife+, de l'EGF est apporté aux cellules à tous les stades de culture. L'EGF induit les voies de signalisations de la PI3-K/AKT et de ERK qui ont pour effet d'augmenter la production de cycline D1. Cette cycline va aller activer CDK4 qui phosphoryle pRB et libère de cette façon E2F. Ce dernier active alors p16<sup>INK4a</sup> (Figure 4-2). Cela pourrait expliquer la constante et intense expression de p16<sup>INK4a</sup> quand les cellules sont constamment soumises à l'effet de l'EGF.

En milieu KGM+, de l'EGF est aussi ajouté au milieu de culture et le même argument peut-être avancé pour expliquer la constante expression de p16<sup>INK4a</sup> avec la différenciation.

## Discussion et perspectives

Par contre, la raison pour laquelle l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne varie pas dans le milieu KGM- ne contenant pourtant pas de facteur de croissance reste à expliquer.

### 2.2 Pourquoi p16<sup>INK4a</sup> est-il régulé négativement par la différenciation dans notre modèle ?

#### L'hypothèse de l'amphiréguline

En milieu Epilife-, aucun facteur de croissance n'est ajouté au milieu, les cellules produisent ce dont elles ont besoin. Le facteur de croissance qu'elles produisent est l'amphiréguline (Poumay et al., 1995) qui est capable aussi, mais dans une moindre mesure que l'EGF, d'activer le récepteur de l'EGF. L'amphiréguline permet ainsi la prolifération cellulaire.

La diminution d'expression de p16<sup>INK4a</sup> observée avec la différenciation cellulaire dans notre modèle pourrait être expliquée comme suit. A sous-confluence, les cellules prolifèrent énormément, elles produisent aussi beaucoup d'amphiréguline, celle-ci active les voies de signalisation de la PI3-K/Akt et de ERK, ce qui au final aboutit à la libération de E2F et à une induction de p16<sup>INK4a</sup> (Figure 4-2). A confluence, les cellules prolifèrent beaucoup moins, la production d'amphiréguline est diminuée et donc il y a moins d'induction de p16<sup>INK4a</sup>.

A post-confluence, les cellules ne prolifèrent plus, il y a encore moins de production d'amphiréguline et donc moins de p16<sup>INK4a</sup>. Un argument qui appuie un peu plus cette hypothèse est la diminution de ERK-phosphorylé avec la différenciation dans notre modèle.

Pour démontrer cette hypothèse, on pourrait inhiber le récepteur de l'EGF ou les voies de signalisation en aval et observer comment évolue l'expression de p16<sup>INK4a</sup>. Par ailleurs, il faudrait encore démontrer une régulation de l'expression de l'amphiréguline en fonction de la différenciation dans notre modèle.

#### L'hypothèse de migration

L'hypothèse de la migration cellulaire pourrait remplacer ou compléter celle de l'amphiréguline.

Natarajan et al., 2003, ont démontré que les kératinocytes qui se déplacent *in vitro* (et peut-être même *in vivo*) expriment p16<sup>INK4a</sup>.

Leur interprétation de ce phénomène est la suivante : lorsqu'un kératinocyte se déplace, ce n'est pas le moment pour lui de se diviser ; il exprime donc p16<sup>INK4a</sup> qui bloque le cycle cellulaire.

Cette hypothèse pourrait expliquer la forte expression de p16<sup>INK4a</sup> dans notre modèle à sous-confluence, mais ne peut expliquer la persistance (même avec diminution) de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> à confluence et post-confluence, moments auxquels nous savons que les kératinocytes ne se déplacent plus.



### **3. Analogie entre l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans notre modèle et celle observée dans les carcinomes épidermoïdes**

Les carcinomes épidermoïdes sont des tumeurs malignes dérivées des épithéliums. En particulier, ils se développent au niveau de la peau suite à une transformation maligne des kératinocytes (à tout le moins, de leurs cellules souches). Tous les carcinomes épidermoïdes montrent un certain degré de différenciation de type épidermique (d'où leur nom).

Nous avons observé dans une étude parallèle à ce mémoire, que lorsque p16<sup>INK4a</sup> est exprimé dans les cellules malignes des carcinomes épidermoïdes (ce qui est fréquent), il montre une régulation comparable à ce que nous observons dans notre modèle, à savoir, une expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les «couches basales» et qui diminue vers les couches de kératinisation (Figure 4-3).

A ce stade de nos travaux, à tout le moins deux questions peuvent être posées.

- 1) p16<sup>INK4a</sup> subit-il dans les carcinomes épidermoïdes une régulation dans le cadre de phénomènes autocrine (amphiréguline, EGF) ?
- 2) L'expression de p16<sup>INK4a</sup> ne serait-elle qu'un épiphénomène dans la dérégulation du cycle cellulaire de ces cellules malignes ?

#### **4. p16<sup>INK4a</sup> est exprimé non seulement dans les noyaux mais également dans le cytoplasme des kératinocytes**

Dans les kératinocytes épidermiques cultivés en milieu autocrine, une expression de p16<sup>INK4a</sup> nucléaire (attendue) que cytoplasmique (inattendue) est observée.

Cette distribution a été étudiée en microscopie confocale et par centrifugation.

La technique de séparation du noyau et du cytoplasme par centrifugation a permis de confirmer l'expression cytoplasmique intense de p16<sup>INK4a</sup> mais la microscopie confocale a permis une analyse plus fine bien que non quantitative des phénomènes se déroulant dans ces deux fractions.

Dans le noyau, on observe une diminution d'expression de p16<sup>INK4a</sup> avec la différenciation avec une quasi disparition de ce signal à post-confluence. Ces résultats vont dans le même sens que l'expression globale de p16<sup>INK4a</sup> détectée par Western Blot.

Dans le cytoplasme, bien que la technique immunohistochimique ne soit pas quantitative, il semblerait que de la sous-confluence à la confluence on observe une augmentation du nombre de cellules marquées et de la confluence à la post-confluence une diminution de celles-ci.

Un marquage très intense et total du cytoplasme est observé à la sous-confluence. A confluence, la plupart des cellules marquées le sont entièrement mais quelques cellules ne montrent qu'un marquage en périphérie de la cellule. Au stade de post-confluence enfin, le marquage est beaucoup moins important.

Le rôle que tient p16<sup>INK4a</sup> dans le cytoplasme n'est malheureusement pas encore connu.

Une voie d'étude intéressante pourrait être la translocation cytoplasmique comme celle démontrée pour p27 (Besson et al., 2004).

La protéine p27 est un membre de la famille des Cip/Kip protéines et est un inhibiteur de la prolifération cellulaire dont l'expression est induite par différents signaux anti-mitogènes. p27 exerce son activité anti-proliférative par association avec les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines, prévenant ainsi leurs liaison à l'ATP et bloquant leur activité catalytique. Dans les cellules cancéreuses, p27 est fréquemment transloquée du noyau dans le cytoplasme au lieu d'être éliminé.

Une explication pour cette observation a été proposée par Besson et al. en 2004. En effet, les auteurs ont montré qu'en plus d'être un inhibiteur de la prolifération cellulaire quand il est localisé dans le noyau, p27 est un régulateur de la structure du cytosquelette et de la migration cellulaire quand il est localisé dans le cytoplasme. Quand les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines se retrouvent dans le cytoplasme, ils promeuvent l'assemblage ainsi que l'import nucléaire de complexes cyclineD-CDK, ce qui conduit à l'inhibition de l'apoptose et peut-être à la stimulation de la migration cellulaire (Besson et al., 2004).

Sachant que p16<sup>INK4a</sup> est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines et sachant que p16<sup>INK4a</sup> est transloqué dans le cytoplasme, on pourrait dès lors explorer un éventuel rôle de p16<sup>INK4a</sup> au niveau du cytosquelette des kératinocytes.

## **5. Réponse de p16<sup>INK4a</sup> à l'irradiation aux UV de kératinocytes épidermiques**

Piepkorn, 1999, Pavey et al., 1999, Ahmed et al., 1998, Chazal et al., 2002, entre autres, ont montré une induction de p16<sup>INK4a</sup> par les UV.

D'un point de vue ARNmessagers, il semblerait, dans nos mains, que les UV n'affectent pas l'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les kératinocytes exposés à des doses de 150, 300 et 500mJ/cm<sup>2</sup>. Dans leur article, Chazal et al., 2002, qui n'ont pas non plus détecté de modification dans l'ARNm, ont émis l'hypothèse que la régulation de p16<sup>INK4a</sup> par les UV se ferait plutôt à un niveau post-transcriptionnel. L'effet des UV sur les kératinocytes a donc été étudié au niveau des protéines.

Globalement, on peut dire que, dans nos mains, l'expression de p16<sup>INK4a</sup> est induite par un traitement aux UV quand les kératinocytes se trouvent au stade de post-confluence, que les cellules aient été traitées avec une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup> de rayons UV ou avec 8 doses de 300mJ/cm<sup>2</sup> d'UV.

Au stade de sous-confluence quand les cellules sont traitées avec une dose de 500mJ/cm<sup>2</sup>, on observe une diminution d'expression de p16<sup>INK4a</sup> dans les cellules traitées. Néanmoins, la protéine p53, marqueur classique de l'exposition aux UV n'est pas induite dans les cellules traitées.

L'expression des protéines étant réalisées 6 heures, 12 heures et 24 heures après l'irradiation, on peut se poser la question de savoir si la diminution d'expression de p16<sup>INK4a</sup> que l'on observe à sous-confluence n'est pas le reflet de la différenciation (comme suggéré dans les cellules contrôles) accélérée par des faibles doses d'UV. Pour vérifier cette hypothèse de différenciation, il serait bon de détecter les marqueurs de différenciation K10 et involucrine sur ces cellules.

A la sous-confluence des cellules traitées plusieurs fois, il ne semble pas y avoir de variation de p16<sup>INK4a</sup> alors que p53 est bien induit. Par contre, à post-confluence la répétition de l'exposition aux UV conduit apparemment à une majoration discrète de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> ce qui est en accord avec la littérature.

Ces résultats sont encore trop préliminaires que pour en tirer des conclusions si ce n'est qu'il semble bien y avoir une régulation de l'expression protéique de p16<sup>INK4a</sup> par les UV et que cette régulation serait différente à sous-confluence et à post-confluence.

# Bibliographie

## Bibliographie

1. Ahmed. Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB-irradiated human epidermis and cultured keratinocytes. *Journal of dermatology Science*, 175-181 (1999).
2. Baldwin, P., Laskey, R. & Coleman, N. Translational approaches to improving cervical screening. *Nat Rev Cancer* **3**, 217-26 (2003).
3. Barbosa. In Vitro Biological Activities of the E6 and E7 Genes Vary among Human Papillomavirus of Different Oncogenic Potential. *Journal of Virology*, 292-298 (1991).
4. Bartek, J. & Lukas, J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* **490**, 117-22 (2001).
5. Bennett. Molecular Regulation of Melanocyte Senescence. *Pigment Cell Res* **15**, 242-250 (2002).
6. Besson. Regulation of the Cytoskeleton: An Oncogenic Function for CDK Inhibitors? *Nat Rev Cancer* **4**, 948-955 (2004).
7. Bill. Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Regulation of Integrin-Mediated Signaling and Cell Cycle Entry in Epithelial Cells. *Mol Cell Biol* **24**, 8586-8599 (2004).
8. Boyce, S. T. & Ham, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* **81**, 33s-40s (1983).
9. Bringold, F. & Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* **35**, 317-29 (2000).
10. Brown. p16<sup>INK4a</sup> and p14<sup>ARF</sup> Tumor Suppressor Genes Are Commonly Inactivated in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* **122**, 1284-1292 (2004).
11. Chaturvedi, V. et al. Role of INK4a/Arf locus-encoded senescent checkpoints activated in normal and psoriatic keratinocytes. *Am J Pathol* **162**, 161-70 (2003).
12. Chazal. p16<sup>INK4A</sup> is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene* **21**, 2652-2661 (2002).
13. Chin, L., Pomerantz, J. & DePinho, R. A. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci* **23**, 291-6 (1998).
14. Cook, P. W., Pittelkow, M. R. & Shipley, G. D. Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol* **146**, 277-89 (1991).
15. Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* **13**, 65-70 (2003).
16. Denicourt, C. & Dowdy, S. F. Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev* **18**, 851-5 (2004).
17. Dickson, M. A. et al. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol* **20**, 1436-47 (2000).
18. Fehrmann, F. & Laimins, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22**, 5201-7 (2003).
19. Fuchs, E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* **17**, 197-208 (1993).
20. Fuxe. p16<sup>INK4a</sup> and p15<sup>INK4b</sup> in senescence, immortalization and cancer. Gene transfer by adenovirus vectors. (*Thèse*), 1-95 (2001).
21. Gruijl, d. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **63**, 19-27 (2001).

## Bibliographie

22. Hausen, H. z. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**, 342-350 (2002).
23. Holbrook, K. A. The structure and development of skin. *Dermatology in General medicine*, 93-131 (1987).
24. Ishida. Role for E2F in control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4684-4699 (2001).
25. Keith. Drug insight: cancer cell immortality-telomerase as a target for novel cancer gene therapies. *Nat Clin Pract Oncol* **1**, 88-96 (2004).
26. Khleif. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4350-4354 (1996).
27. Krishnamurthy, J. et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* **114**, 1299-307 (2004).
28. Mosavi, L. K., Minor, D. L., Jr. & Peng, Z. Y. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16029-34 (2002).
29. Murao, K., Kubo, Y., Takiwaki, H., Arase, S. & Matsumoto, K. Bowen's disease on the sole: p16INK4a overexpression associated with human papillomavirus type 16. *Br J Dermatol* **152**, 170-3 (2005).
30. Nakamura, S. & Nishioka, K. Enhanced expression of p16 in seborrheic keratosis; a lesion of accumulated senescent epidermal cells in G1 arrest. *Br J Dermatol* **149**, 560-5 (2003).
31. Natarajan. Co-Expression of p16<sup>INK4a</sup> and Laminine 5 $\gamma$ 2 by Micoinvasive and Superficial Squamous Cell Carcinomas *in Vivo* and by Migrating Wound and Senescent Kertinocytes in culture. *Am J Pathol* **163**, 477-491 (2003).
32. Nevins, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 699-703 (2001).
33. Nilsson, K., Svensson, S. & Landberg, G. Retinoblastoma protein function and p16INK4a expression in actinic keratosis, squamous cell carcinoma in situ and invasive squamous cell carcinoma of the skin and links between p16INK4a expression and infiltrative behavior. *Mod Pathol* **17**, 1464-74 (2004).
34. Pavey, S., Conroy, S., Russell, T. & Gabrielli, B. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res* **59**, 4185-9 (1999).
35. Piepkorn, M. The expression of p16(INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. *J Am Acad Dermatol* **42**, 741-5 (2000).
36. Pittelkow, M. R., Cook, P. W., Shipley, G. D., Derynck, R. & Coffey, R. J., Jr. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ* **4**, 513-21 (1993).
37. Poumay, Y. & Pittelkow, M. R. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* **104**, 271-6 (1995).
38. Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-43 (1975).
39. Salama, M. E. et al. p16INK4a expression in actinic keratosis and Bowen's disease. *Br J Dermatol* **149**, 1006-12 (2003).
40. Satyanarayana, A. & Rudolph, K. L. p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest* **114**, 1237-40 (2004).

## Bibliographie

41. Schuler, M. & Green, D. R. Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet* **21**, 182-7 (2005).
42. Sedman. The Full-Length E6 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Has Transforming and trans-Activating Activities and Cooperates with E7 To Immortalize Keratinocytes in Culture. *Journal of virology* **65**, 4860-4866 (1991).
43. Serrano, M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* **237**, 7-13 (1997).
44. Sharpless, N. E. *INK4a/ARF*: A multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* (2005).
45. Sherr, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**, 3689-95 (2000).
46. Steven, A. C. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin-two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J Struct Biol* **104**, 150-162 (1990).
47. Tang, K. S., Fersht, A. R. & Itzhaki, L. S. Sequential unfolding of ankyrin repeats in tumor suppressor p16. *Structure (Camb)* **11**, 67-73 (2003).
48. Vidal, A. & Koff, A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**, 1-15 (2000).
49. Wang, W. et al. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* **22**, 3389-403 (2002).